

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



**Efecto de la centrifugación previa al congelado sobre la calidad seminal
posdescongelación en toros Charolais**

Por:

Francisco Medina Robles

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Junio 2026

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

**Efecto de la centrifugación previa al congelamiento sobre la calidad seminal
posdescongelación en toros Charolais**

Por:

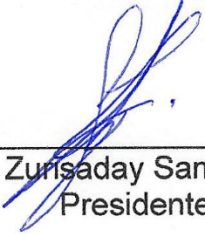
Francisco Medina Robles

TESIS

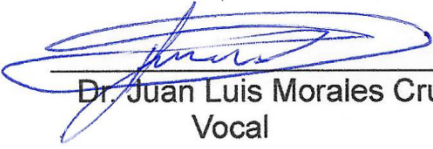
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


Dra. Zurisaday Santos Jiménez
Presidente


MC. Maurilio Solorio Ochoa
Vocal externo


Dr. Juan Luis Morales Cruz
Vocal


Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz
Vocal suplente


M.V.Z. Eric Alejandro Reyes Ramírez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Junio 2026

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

**Efecto de la centrifugación previa al congelado sobre la calidad seminal
posdescongelación en toros Charolais**

Por:

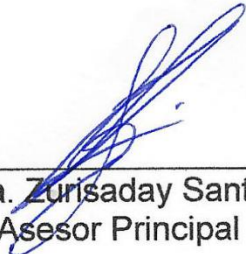
Francisco Medina Robles

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

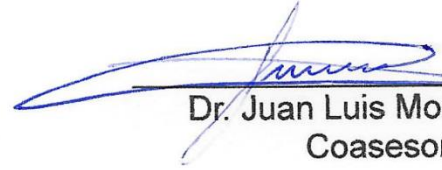
Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Zurisaday Santos Jiménez
Asesor Principal



MC. Maurilio Solorio Ochoa
Asesor Principal Externo



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Coasesor



M.V.Z. Eric Alejandro Reyes Ramírez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Junio 2026

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer ante todo a **Dios** por darme las fuerzas de seguir adelante día a día y no dejarme rendir.

A mi padre y madre Francisco Medina Frías y Gisela Robles Ruiz, quiero darles las gracias por siempre apoyarme en mis sueños y darme toda esa felicidad día a día,

A mi novia Maricela Denisse Martínez Torres que ha estado en momentos difíciles y dándome todo el amor y ánimo.

Quiero agradecer a mis asesores de tesis a la Dra. Zurisaday Santos Jiménez y al Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz, estoy sumamente agradecido por todo lo que nos enseñaron académicamente y como personas lo que nos han apoyado, me llevo un enorme respeto hacia ustedes, gracias por todo.

A mis amigos que estuvieron para mí en todo momento Julio, Marisol, Alejandra, Félix, Diego, Jonathan y Pedro.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico principalmente a mis padres **Francisco Medina Frías y Gisela Robles Ruiz**, esto es en honor hacia ustedes por no rendirse y ser unos verdaderos padres que se esforzaron al máximo para que a sus hijos no les falte nada, lo quiero mucho y esto es para ustedes que me llenan de orgullo.

A mi segunda madre **Avelina Baeza Bertadillo** mi madre chula, que me cuido desde pequeño, siempre te voy a agradecer por estar conmigo y ser parte de mi vida entera por siempre darme ánimos de echarle ganas a la vida, te quiero mucho.

A mis hermanos **Ana Daniela Medina Robles y Gustavo Medina Robles** parte importante de mi vida, los dos pous que siempre han estado conmigo los quiero mucho y siempre estaré para ustedes.

A mis otros hermanos **Hugo cesar Salazar Baeza, Armando Salazar Baeza y Miguel Ángel Salazar Baeza**, me enseñaron bastante, me enseñaron a no rendirme, a ser mejor persona, siempre me apoyaron y me alegra tanto que formen parte de mi vida.

Esta tesis también va dedicada para toda la Familia **Medina** y la Familia **Robles** para mis tías, tíos, primos y primas.

Atte: Francisco Medina Robles.

CONTENIDO

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- HIPÓTESIS	4
III.- OBJETIVO	4
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Importancia económica de la inseminación artificial bovina.	5
4.2 Raza charoláis.	6
4.3. Anatomía reproductiva del toro.	7
4.3.1 Testículos.	7
4. 3.2 Epidídimo.	8
4.3.3 Glándulas sexuales accesorias.	8
4.4. Espermatogénesis.....	9
4.4.1 Células germinales.	9
4.4.2 Meiosis.	9
4.4.3 Espermioogénesis.	10
4.4.4 ultraestructura del espermatozoide en bovinos.	10
4.5 Morfología espermática en bovinos.....	11
4.6 composición bioquímica del plasma seminal.	13
4.6.1 Proteínas BSP (Binder of Sperm Proteins).	14
4.6.2 Antioxidantes del plasma seminal.....	15
4.6.3 Enzimas presentes en el plasma seminal.	16
4.6.4 Minerales y elementos traza.	16
4.7 Evaluación seminal.	17
4.7.1 Motilidad espermática.....	17
4.7.2 Concentración espermática.....	18
4.7.3 Viabilidad espermática.....	18
4.7.4 Integridad de membrana plasmática.....	18
4.7.5 Morfología espermática.....	19
4.7.6 HOST (Hypoosmotic Swelling Test).	19
4.8 Criopreservación.	20
4.9 Efecto de la criopreservación.	21
4.10 Crioprotectores y diluyentes	23
4.11 Estrés oxidativo durante el congelamiento y descongelamiento.	24

4.12 La centrifugación previa al congelado.....	26
4.13 Fertilidad del semen congelado.....	27
4.14 Daño mitocondrial durante la criopreservación.....	30
4.15 Fragmentación del ADN espermático.....	32
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1. Área de estudio	35
5.2. Animales experimentales	35
5.3. Obtención de semen	35
5.4. Evaluación seminal.....	36
5.5. Procesamiento y criopreservación seminal	37
5.6 Diseño experimental	37
5.6.1 Curva de enfriamiento, congelación y descongelación seminal.....	39
5.7 Evaluaciones por duplicado	41
5.8 Análisis estadístico	41
VI. RESULTADOS.....	44
6.1 Viabilidad espermática	44
6.2 Motilidad espermática.....	45
6.3 Integridad funcional de membrana (HOST)	46
VII. DISCUSIÓN	48
VIII.CONCLUSIÓN.....	54
IX. LITERATURA CITADA	55

Índice de figuras

Figura 1 Lesiones en la membrana plasmática del espermatozoide (Sharafi et al., 2022).....	22
Figura 2 Colocación de pajillas en nitrógeno líquido para evitar choque térmico. Variables de repuesta.....	40
Figura 3 Lectura de laminillas en prueba HOST y tinción eosina negrosina para determinar viabilidad.	40
Figura 4 Lectura y clasificación de laminillas.....	41

Índice de cuadros

Cuadro 1 Viabilidad espermática (%) por efectos principales	44
Cuadro 2 Motilidad (%) por efectos principales.....	46
Cuadro 3 HOST (%) por efectos principales	47

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la centrifugación previa al proceso de congelación sobre la calidad seminal posdescongelación en toros Charolais. Se utilizaron dos toros Charolais sexualmente maduros, de los cuales se obtuvieron tres eyaculados mediante vagina artificial. Cada eyaculado fue dividido en dos tratamientos: semen no centrifugado (T1) y semen centrifugado previamente al congelado (T2). Las muestras fueron evaluadas durante tres etapas de procesamiento: fresco, refrigerado a 5 °C y posdescongelado. Las variables analizadas fueron motilidad total, viabilidad espermática mediante tinción eosina-negrosina e integridad funcional de la membrana plasmática mediante la prueba hipoosmótica (HOST). Los resultados mostraron que la etapa de procesamiento seminal fue el principal factor que afectó la calidad espermática. La viabilidad disminuyó significativamente desde $77.83 \pm 2.69\%$ en semen fresco hasta $63.83 \pm 3.59\%$ en semen posdescongelado ($P < 0.05$). De manera similar, la motilidad se redujo de $87.92 \pm 0.96\%$ en las etapas fresco y refrigerado a $47.08 \pm 4.10\%$ después de la descongelación ($P < 0.05$). La integridad funcional de membrana también disminuyó significativamente durante el proceso, pasando de $69.33 \pm 3.07\%$ en semen fresco a $57.04 \pm 1.47\%$ en semen posdescongelado ($P < 0.05$). El tratamiento con centrifugación presentó una mayor viabilidad espermática (75.33 ± 2.71 vs. $67.22 \pm 2.73\%$; $P < 0.05$) y una mayor integridad funcional de membrana (67.00 ± 2.08 vs. $60.06 \pm 2.06\%$; $P < 0.05$) en comparación con el grupo no centrifugado. Asimismo, se observó una tendencia favorable en la motilidad del grupo centrifugado. Se concluye que la centrifugación previa al congelado

contribuye a preservar la viabilidad espermática y la integridad funcional de la membrana plasmática después de la criopreservación, por lo que representa una alternativa prometedora para optimizar los protocolos de congelación seminal en toros Charolais.

Palabras clave: Criopreservación seminal, Centrifugación, Toro Charolais, Viabilidad espermática, Integridad de membrana

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of centrifugation prior to freezing on post-thaw semen quality in Charolais bulls. Two sexually mature Charolais bulls were used, and three ejaculates were collected using an artificial vagina. Each ejaculate was divided into two treatments: non-centrifuged semen (T1) and centrifuged semen before cryopreservation (T2). Samples were evaluated at three processing stages: fresh, refrigerated (5 °C), and post-thaw. The variables analyzed were total motility, sperm viability assessed by eosin-nigrosin staining, and functional plasma membrane integrity assessed by the hypoosmotic swelling test (HOST). The results showed that semen processing stage was the main factor affecting sperm quality. Viability decreased significantly from $77.83 \pm 2.69\%$ in fresh semen to $63.83 \pm 3.59\%$ after thawing ($P < 0.05$). Similarly, motility declined from $87.92 \pm 0.96\%$ in both fresh and refrigerated semen to $47.08 \pm 4.10\%$ after thawing ($P < 0.05$). Functional membrane integrity also decreased significantly during processing, from $69.33 \pm 3.07\%$ in fresh semen to $57.04 \pm 1.47\%$ in post-thaw semen ($P < 0.05$). The centrifuged treatment showed greater sperm viability (75.33 ± 2.71 vs. $67.22 \pm 2.73\%$; $P < 0.05$) and higher membrane integrity (67.00 ± 2.08 vs. $60.06 \pm 2.06\%$; $P < 0.05$) than the non-centrifuged treatment. In addition, a favorable trend in motility was observed in the centrifuged group. It is concluded that pre-freezing centrifugation contributes to preserving sperm viability and functional plasma membrane integrity after cryopreservation and may represent a useful strategy for improving semen freezing protocols in Charolais bulls.

Keywords: Semen cryopreservation, Centrifugation, Charolais bull, Sperm viability, Membrane integrity

I.- INTRODUCCIÓN

Actualmente, el semen congelado es la opción más común para la inseminación artificial en bovinos. Los toros destinados a la producción de semen para congelación suelen mantenerse en centros especializados donde se les entrena para que eyaculen en una vagina artificial. El semen recolectado se procesa congela de forma periódica hasta alcanzar la cantidad necesaria de dosis para la inseminación (Ferrer et al., 2017). La inseminación artificial (IA) constituye una de las biotecnologías reproductivas más importantes para el mejoramiento genético bovino debido a su capacidad para acelerar el progreso genético, optimizar el uso de sementales superiores y reducir la transmisión de enfermedades venéreas. El éxito de esta técnica depende en gran medida de la calidad seminal y de la capacidad de los espermatozoides para conservar su funcionalidad después de los procesos de refrigeración y congelación-descongelación. Sin embargo, la criopreservación induce múltiples alteraciones estructurales y funcionales que comprometen la fertilidad del semen congelado (Purdy, 2006; Andrabi, 2009). La inseminación artificial con semen congelado se ha convertido en un pilar para el avance en la industria lechera. No obstante, los procesos de congelación y descongelación pueden dañar a los espermatozoides, y algunos toros presentan mayor sensibilidad a estos efectos, lo que limita la difusión de su material genético. Las tecnologías de reproducción asistida intentan implementar métodos novedosos para seleccionar los gametos de mejor calidad, ayudando a mitigar estos inconvenientes. Entre otras técnicas destacan los procedimientos que reproducen,

en condiciones de laboratorio, la selección natural de espermatozoides más fértiles dentro del tracto reproductor femenino (Salman et al., 2023).

La raza Charoláis representa una de las principales razas bovinas especializadas en producción de carne a nivel mundial debido a su elevada ganancia diaria de peso, eficiencia alimenticia y excelente rendimiento en canal. En programas modernos de mejoramiento genético, la utilización de semen congelado proveniente de toros Charoláis élite permite la difusión masiva de características productivas deseables, aumentando la rentabilidad de los sistemas de producción bovina (Mapletoft & Hasler, 2005; Foote, 2002). Durante la criopreservación, los espermatozoides experimentan cambios osmóticos, estrés oxidativo, daño mitocondrial, alteraciones de membrana plasmática y fragmentación del ADN. Estas modificaciones reducen significativamente la motilidad progresiva, la viabilidad celular y la capacidad fecundante. Se estima que entre el 30 y el 50 % de los espermatozoides sufren algún grado de daño irreversible durante el proceso de congelación y descongelación (Watson, 2000; Bailey et al., 2000). Una estrategia utilizada para mejorar la calidad seminal consiste en la centrifugación previa al congelado. Este procedimiento permite eliminar parte del plasma seminal y concentrar los espermatozoides antes de su dilución con medios crioprotectores. Diversos estudios sugieren que la reducción del plasma seminal puede disminuir la acción perjudicial de determinadas proteínas y enzimas durante la conservación, aunque otros trabajos reportan efectos negativos asociados al daño mecánico generado por la centrifugación (Murphy et al., 2018; Hoogewijs et al., 2012). La centrifugación mediante gradientes de densidad usando coloides es una técnica

recomendada por la organización mundial de la salud para preparar espermatozoides en reproducción asistida humana. En el ámbito animal, este método se considera una opción prometedora para mejorar la calidad del semen tras su criopreservación. Mas recientemente, se ha desarrollado una variante llamada centrifugación en una sola capa (SLC), diseñada para optimizar la calidad del semen antes de su conservación y su uso en la inseminación artificial. Esta técnica logra obtener espermatozoides de mejor calidad, caracterizados por una mayor movilidad y membranas intactas. (Gloria et al., 2016). Por lo anterior, comprender los efectos de la centrifugación sobre la calidad seminal posdescongelación resulta fundamental para optimizar los protocolos de criopreservación utilizados en centros de inseminación bovina. El presente ensayo analiza los fundamentos biológicos y tecnológicos relacionados con la centrifugación previa al congelado y su impacto sobre la calidad seminal de toros Charoláis.

II.- HIPÓTESIS

La centrifugación previa al proceso de congelación mejora la calidad seminal posdescongelación en toros Charoláis, incrementando la motilidad, viabilidad e integridad de membrana espermática en comparación con semen no centrifugado.

III.- OBJETIVO

Evaluar el efecto de la centrifugación previa al proceso de congelación sobre la calidad seminal posdescongelación en toros Charoláis mediante la determinación de parámetros de motilidad, viabilidad, integridad de membrana y morfología espermática.

IV.- REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia económica de la inseminación artificial bovina.

La inseminación artificial ha transformado la industria bovina mundial al permitir el aprovechamiento intensivo de sementales genéticamente superiores. Mediante esta tecnología, un solo toro puede producir miles de dosis seminales al año, lo que incrementa considerablemente la velocidad de difusión genética dentro de una población bovina (Foote, 2002; Vishwanath, 2003). Desde el punto de vista económico, la IA reduce los costos asociados al mantenimiento de toros reproductores en las unidades de producción. La adquisición, alimentación, manejo sanitario y reemplazo de sementales representan gastos significativos para los productores, especialmente en sistemas extensivos de producción de carne (Diskin & Kenny, 2016). Además de los beneficios genéticos, la IA contribuye al control sanitario de los hatos. La reducción del contacto directo entre machos y hembras disminuye la transmisión de enfermedades reproductivas como campilobacteriosis, tricomoniasis y rinotraqueítis infecciosa bovina. Esto genera importantes beneficios económicos al reducir pérdidas reproductivas y costos veterinarios (Thibier & Wagner, 2002). La utilización de semen congelado permite también el intercambio internacional de material genético. Países productores pueden importar semen de toros con evaluaciones genéticas sobresalientes sin necesidad de movilizar animales vivos, reduciendo riesgos sanitarios y costos de transporte (Mapletoft & Hasler, 2005). En bovinos productores de carne, como la raza Charoláis, la IA ha permitido incrementar significativamente parámetros productivos relacionados con crecimiento, conformación muscular y rendimiento en canal. Esto se traduce en

mayores ingresos para los productores y una mayor eficiencia de la industria cárnica (Perry, 2016). La eficiencia reproductiva derivada del uso de semen congelado depende directamente de la calidad espermática posdescongelación. Por ello, cualquier mejora en los protocolos de procesamiento seminal tiene repercusiones económicas directas sobre la rentabilidad de los programas de inseminación artificial (Amann & DeJarnette, 2012).

4.2 Raza charoláis.

El ganado bovino juega un papel fundamental para las personas al proporcionar productos como carne, leche, piel y fuerza de trabajo. No obstante, debido a que su ciclo reproductivo es largo y las tasas de reproducción en el ganado de carne son baja, la mejora genética avanza lentamente. Con la implementación de técnicas moleculares es posible realizar una selección temprana, lo que acelera el proceso de cría. Las características relacionadas con el crecimiento y la calidad de la carne son muy importantes, ya que afectan tanto la eficiencia del uso de recursos como la rentabilidad de los agricultores. Estas cualidades suelen ser moderadamente hasta altamente heredables, por lo que es esencial seleccionar razas especiales para mejorar estos atributos en las poblaciones de ganado. La raza charoláis es reconocida mundialmente por su gran tamaño y rápido crecimiento además de producir carne de alta calidad con buen rendimiento de canal y adaptarse fácilmente en diferentes ambientes, la carne de esta raza es apreciada por su contenido elevado de proteínas y su valor nutricional, lo que la convierte en favorita para programas de mejoramiento genético en varios países (Zhang et al., 2025).

La producción de ganado charoláis en Eslovaquia comenzó después del año 1992, cuando la cooperativa agro comercial de Skalica inicio la importación de embriones desde estados unidos. Desde entonces la raza se desarrolló hasta convertirse en una de las principales razas de carne en el país, hoy en día el rendimiento del ganado charoláis es comparable al de los criadores más avanzados, demostrando su importancia y éxito en la industria ganadera nacional (Bujko et al., 2022).

La amplia expansión del ganado charoláis se atribuye a su habilidad para adaptarse, su rapidez en el desarrollo, resistencia, fuerza y tendencia a aumentar de peso a cualquier edad. Esta raza se encuentra en zonas con climas subtropical, tropical, templado y árido, donde logra aclimatarse exitosamente (Vega et al., 2019).

El estrés climático se ha convertido en un reto importante que afecta seriamente la producción animal, generando pérdidas cercanas al 10% del valor comercial total de la leche y carne a nivel mundial, esta situación explica la gran cantidad de recursos y esfuerzos que se destinan a estudiar y mitigar los efectos negativos que este tipo de estrés provoca en el sector ganadero (Suarez et al., 2024).

4.3. Anatomía reproductiva del toro.

4.3.1 Testículos.

Los testículos constituyen las principales glándulas reproductoras masculinas y desempeñan funciones endocrinas y exocrinas. Su función endocrina consiste en la producción de testosterona por las células de Leydig, mientras que la función exocrina corresponde a la producción de espermatozoides dentro de los túbulos seminíferos (Hafez & Hafez, 2013). Los túbulos seminíferos representan

aproximadamente el 80 % del volumen testicular y albergan las células germinales en diferentes etapas de desarrollo. Las células de Sertoli proporcionan soporte estructural, nutricional y regulador durante la espermatogénesis (Johnson et al., 2000). La producción espermática está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada mediante la acción coordinada de GnRH, FSH, LH y testosterona. Alteraciones en cualquiera de estos componentes pueden afectar significativamente la calidad seminal (Senger, 2012).

4. 3.2 Epidídimo.

El epidídimo es una estructura tubular altamente especializada dividida en cabeza, cuerpo y cola. Durante el tránsito epididimario los espermatozoides adquieren motilidad progresiva y capacidad fecundante mediante modificaciones bioquímicas de su membrana plasmática (Cooper, 2011). La cabeza del epidídimo participa principalmente en la absorción de líquido testicular. El cuerpo constituye una región de intensa modificación molecular, mientras que la cola funciona como sitio de almacenamiento espermático previo a la eyaculación (Robaire & Hinton, 2015).

4.3.3 Glándulas sexuales accesorias.

Las glándulas accesorias incluyen vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales. Estas estructuras producen la mayor parte del plasma seminal, aportando nutrientes, proteínas, antioxidantes y factores reguladores que influyen sobre la función espermática (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Las vesículas seminales constituyen la principal fuente de proteínas del plasma seminal bovino,

incluyendo las proteínas BSP (Binder of Sperm Proteins), fundamentales en los procesos de capacitación espermática (Manjunath et al., 2007).

4.4. Espermatogénesis.

La espermatogénesis es un proceso biológico altamente organizado mediante el cual las células germinales diploides se transforman en espermatozoides haploides funcionales. En bovinos este proceso tiene una duración aproximada de 61 días y ocurre dentro de los túbulos seminíferos (Amann & Schanbacher, 1983).

4.4.1 Células germinales.

Las espermatogonias constituyen las células madre germinales localizadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos. Estas células experimentan sucesivas divisiones mitóticas para mantener la población celular y generar espermátocitos primarios (Johnson et al., 2000). La proliferación adecuada de las espermatogonias es esencial para mantener la producción espermática durante toda la vida reproductiva del toro. Factores ambientales, nutricionales y hormonales pueden influir significativamente sobre este proceso (Senger, 2012).

4.4.2 Meiosis.

Los espermátocitos primarios inician la meiosis I, proceso mediante el cual se reduce el número cromosómico de diploide a haploide. Posteriormente se produce la meiosis II, generándose cuatro espermátidas haploides a partir de cada espermátocito primario (Griswold, 2016). Durante la meiosis ocurren fenómenos de recombinación genética que incrementan la variabilidad genética de la

descendencia. La integridad cromosómica durante esta etapa es esencial para la fertilidad masculina (Handel & Schimenti, 2010).

4.4.3 Espermiogénesis.

La espermiogénesis corresponde a la transformación morfológica de las espermatidas redondas en espermatozoides maduros. Durante este proceso se forma el acrosoma, se condensa el núcleo, se desarrolla el flagelo y se reorganizan las mitocondrias en la pieza media (Russell et al., 1990). La condensación de la cromatina mediante protaminas constituye uno de los eventos más importantes de la espermiogénesis, ya que proporciona protección al ADN espermático frente a daños oxidativos y físicos (Oliva, 2006). Al finalizar la espermiogénesis, los espermatozoides son liberados hacia la luz tubular mediante el proceso denominado espermiación. No obstante, estas células aún carecen de capacidad fecundante completa y requieren atravesar el epidídimo para completar su maduración funcional (Cooper, 2011).

4.4.4 ultraestructura del espermatozoide en bovinos.

La evaluación de la calidad del semen tiene un valor económico significativo en la gestión reproductiva, ya que facilita la selección de toros con alto desempeño reproductivo. Los toros son examinados por su estado de salud, deseo sexual y habilidades para el apareamiento, mientras que su semen se somete a análisis de volumen, concentración espermática, movilidad, viabilidad, forma y capacidad para resistir los procesos de congelación y descongelación (Sakosek et al., 2021).

El espermatozoide es una célula altamente especializada y compacta, con una longitud que varía entre los 50 y 60 micrómetros, que no experimenta crecimiento ni división. Está compuesto por una cabeza, que aloja el material genético del padre, y una cola que permite su movilidad. Los espermatozoides presentan varias funciones importantes como el desplazamiento, reconocimiento específico, transmisión de señales, exocitosis, función con otras células y participación de fertilización. Después de formarse en los túbulos seminíferos, los espermatozoides se modifican y permanecen almacenados en el epidídimo hasta ser liberados durante la eyaculación (Boada et al., 1999).

4.5 Morfología espermática en bovinos.

Dentro de los parámetros clásicos para evaluar la calidad seminal, el examen morfológico es especialmente importante debido a su vínculo con la capacidad reproductiva. En particular, el análisis de la cabeza del espermatozoide, que contiene el material genético en forma de cromatina (cromosomas compactados asociados a protaminas), es muy relevante. Esto se puede realizar mediante la observación de la forma mediante diferentes tinciones o midiendo características morfométricas utilizando sistemas computarizados de análisis seminal. Tanto en las formas y medidas morfométricas como la integridad de la cromatina están relacionadas con el potencial reproductivo en toros. Los espermatozoides que presentan anomalías morfológicas en la cabeza no intervienen en la fertilización, mientras que aquellos con cromatina dañada, no garantizan un desarrollo embrionario adecuado (Nava et al., 2012).

Numerosos estudios han demostrado que las alteraciones en la morfología espermática pueden originarse en diferentes momentos del ciclo vital del espermatozoide. Estas etapas incluyen procesos como la espermatogénesis y la espermiogénesis, así como durante el transporte y almacenamiento dentro del epidídimo. Además, también pueden generarse durante la retención de ámpulas, en el momento de la eyaculación o incluso después de que esta ocurra (Arruda et al., 2015). Estudios recientes han evidenciado que la cantidad de zinc (Zn) en la dieta influye en la cantidad de semen en toros durante la pubertad. Particularmente, los investigadores notaron un incremento en los efectos morfológicos en la pieza intermedia y la cola de los espermatozoides, junto con una menor motilidad y una mayor incidencia de irregularidades en la cabeza en los animales que no recibieron suplementación de zinc en su alimentación mineral. En los machos, la falta de zinc se ha relacionado con la atrofia del epitelio tubular y una disminución en la producción de hormonas luteinizante, folículo estimulante y testosterona, o que resulta una inhibición de la espermatogénesis (Fernandes et al., 2009).

En un eyaculado de toro, la cantidad de espermatozoides liberados suele alcanzar un promedio de aproximadamente 5 mil millones, cifra mucho mayor a la requerida para que la fecundación tenga lugar. De hecho, basta con utilizar apenas 3 millones de espermatozoides, o incluso menos si estos son depositados directamente dentro del útero de la hembra para que el proceso sea eficiente. No obstante, por razones de seguridad y para garantizar mejores resultados, en la práctica se emplea una dosis de semen congelado que contiene cerca de 20 millones de espermatozoides (Cavalero et al., 2015).

4.6 composición bioquímica del plasma seminal.

El plasma seminal es una mezcla compleja de secreciones provenientes del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias. Además de funcionar como vehículo de transporte para los espermatozoides, contiene numerosas moléculas bioactivas que regulan la función espermática, la supervivencia celular y la interacción con el tracto reproductor femenino (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Durante muchos años se consideró que el plasma seminal únicamente servía como medio de transporte para los espermatozoides. Sin embargo, actualmente se reconoce que desempeña un papel fundamental en la regulación de la fertilidad masculina mediante la provisión de proteínas, antioxidantes, enzimas, minerales, factores inmunomoduladores y moléculas señalizadoras (Rodríguez-Martínez et al., 2011). La composición bioquímica del plasma seminal varía entre especies, razas e incluso individuos. Factores como edad, nutrición, estado sanitario y estación del año pueden modificar significativamente su contenido molecular y, por consiguiente, influir sobre la calidad seminal (Killian et al., 1993).

El plasma seminal contiene principalmente iones, azúcares y proteínas que contribuyen a la función espermática, mantienen la integridad del acrosoma, protegen las membranas celulares y regulan el estrés oxidativo. Aunque varía mucho entre especie y animales, se ha observado que el plasma seminal puede ser dañino para los espermatozoides de caballo y cerdos durante la criopreservación, en contraste, el plasma seminal es beneficioso para los espermatozoides de las ovejas. En caso de toros, este fluido no se considera perjudicial para el espermatozoide durante el proceso de criopreservación (Zoca et al., 2021). En general muchas de

las técnicas utilizadas para obtener una crio preservación efectiva no actúan directamente sobre el espermatozoide, sino sobre el medio en el que se conserva. El fluido que acompaña a los espermatozoides durante su paso por el epidídimo y en la eyaculación se llama plasma seminal (PS), el cual es producido por el epidídimo y las glándulas accesorias sexuales. Aunque varios estudios destacan los efectos positivos del PS sobre los espermatozoides, también se ha encontrado que puede ocasionar daños, especialmente relacionados con el tiempo que los espermatozoides permanezcan en contacto con este fluido. En la reproducción natural, el contacto entre espermatozoides y PS es breve, pero durante el proceso de crio preservación, el semen diluido puede estar expuesto al PS durante varias horas o incluso el día completo, lo que puede incrementar el daño (Campanholi et al., 2017).

4.6.1 Proteínas BSP (Binder of Sperm Proteins).

Las proteínas BSP constituyen la familia proteica más abundante del plasma seminal bovino. Son sintetizadas principalmente por las vesículas seminales y representan aproximadamente el 60 % de las proteínas presentes en el eyaculado (Manjunath et al., 2007). Estas proteínas se unen rápidamente a la membrana plasmática del espermatozoide después de la eyaculación. Su principal función consiste en regular el transporte de colesterol y fosfolípidos desde la membrana espermática hacia las lipoproteínas presentes en el tracto reproductor femenino, facilitando los procesos de capacitación espermática (Therien et al., 1998).

A pesar de sus efectos fisiológicos beneficiosos, la presencia prolongada de proteínas BSP durante la conservación seminal puede resultar perjudicial. La

continua extracción de lípidos de membrana favorece la desestabilización celular y aumenta la susceptibilidad al daño criogénico durante la congelación (Manjunath & Thérien, 2002). Diversos investigadores han propuesto que la centrifugación previa al congelado podría reducir parcialmente la concentración de proteínas BSP presentes en el semen procesado, disminuyendo sus efectos deletéreos durante la criopreservación (Bergeron et al., 2007).

4.6.2 Antioxidantes del plasma seminal.

Los espermatozoides son particularmente vulnerables al estrés oxidativo debido al elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados presentes en sus membranas plasmáticas. Para contrarrestar esta susceptibilidad, el plasma seminal contiene diversos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Aitken & Baker, 2006). Entre los antioxidantes enzimáticos destacan la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas neutralizan especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas durante el metabolismo celular y durante los procesos de enfriamiento y congelación (Agarwal et al., 2014). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen vitamina E, vitamina C, glutatión reducido, taurina, hipotaurina y diversas moléculas fenólicas. Estos compuestos contribuyen a preservar la integridad estructural de las membranas celulares y del ADN espermático (Lenzi et al., 2002). La capacidad antioxidante total del plasma seminal se ha asociado positivamente con la fertilidad de los toros. Animales con mayores niveles antioxidantes suelen presentar mejor motilidad, viabilidad y capacidad fecundante después de la descongelación (Kumar et al., 2011).

4.6.3 Enzimas presentes en el plasma seminal.

El plasma seminal contiene numerosas enzimas involucradas en procesos metabólicos y funcionales de los espermatozoides. Entre las más importantes se encuentran fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y creatina quinasa (Mann & Lutwak-Mann, 1981). La fosfatasa alcalina constituye un marcador ampliamente utilizado para evaluar la función epididimaria y la integridad del tracto reproductor masculino. Concentraciones reducidas pueden asociarse con alteraciones en el transporte espermático (Rodríguez-Martínez, 2007). El lactato deshidrogenasa participa en el metabolismo energético espermático. Incrementos excesivos de esta enzima en el plasma seminal pueden indicar daño celular y liberación intracelular secundaria a procesos degenerativos (Strzeżek et al., 2005).

4.6.4 Minerales y elementos traza.

Los minerales presentes en el plasma seminal desempeñan funciones esenciales relacionadas con el metabolismo energético, la estabilidad de membranas y la regulación de la motilidad espermática. Entre los principales elementos se encuentran zinc, calcio, magnesio, sodio, potasio y selenio (Underwood & Suttle, 1999). El zinc participa en la estabilización de la cromatina espermática y en la protección antioxidante. Concentraciones adecuadas de este mineral se asocian con una mejor calidad seminal y menor fragmentación del ADN (Colagar et al., 2009). El calcio regula múltiples procesos celulares, incluyendo la motilidad, capacitación y reacción acrosomal. Alteraciones en la homeostasis del calcio pueden afectar significativamente la capacidad fecundante de los espermatozoides

(Publicover et al., 2007). El selenio forma parte estructural de la glutatión peroxidasa y contribuye a la protección antioxidante de las membranas espermáticas. Deficiencias de este elemento se han relacionado con disminución de la fertilidad masculina en diversas especies (Surai, 2006).

4.7 Evaluación seminal.

La evaluación seminal constituye una herramienta indispensable para determinar la capacidad reproductiva de un semental y predecir el potencial fecundante del semen procesado. Ninguna prueba individual permite evaluar completamente la fertilidad, por lo que generalmente se emplea una combinación de técnicas complementarias (Amann & Hammerstedt, 1993).

4.7.1 Motilidad espermática.

La motilidad representa uno de los parámetros más utilizados para evaluar la calidad seminal. Consiste en la capacidad de los espermatozoides para desplazarse de forma progresiva mediante movimientos coordinados del flagelo (Garner & Johnson, 1995). Actualmente la evaluación más precisa se realiza mediante sistemas computarizados CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), los cuales permiten cuantificar objetivamente parámetros cinéticos como velocidad curvilínea, velocidad rectilínea y linealidad (Verstegen et al., 2002). La motilidad posdescongelación constituye uno de los principales indicadores de éxito de los protocolos de criopreservación debido a su estrecha relación con la fertilidad in vivo (Amann & DeJarnette, 2012).

4.7.2 Concentración espermática.

La concentración espermática corresponde al número de espermatozoides presentes por unidad de volumen de semen. Este parámetro es fundamental para calcular las dosis seminales destinadas a inseminación artificial (Foote, 2002). La determinación puede realizarse mediante hemocitómetros, espectrofotometría o sistemas automatizados. Una adecuada concentración asegura que cada dosis contenga un número suficiente de espermatozoides viables para lograr la fecundación (Senger, 2012).

4.7.3 Viabilidad espermática.

La viabilidad refleja el porcentaje de espermatozoides vivos presentes en una muestra seminal. Generalmente se evalúa mediante tinciones supravitales como eosina-nigrosina o mediante citometría de flujo utilizando fluorocromos específicos (Garner & Johnson, 1995). La pérdida de viabilidad durante la congelación se asocia principalmente con daño de membrana plasmática, alteraciones osmóticas y estrés oxidativo (Watson, 2000).

4.7.4 Integridad de membrana plasmática.

La membrana plasmática desempeña funciones esenciales relacionadas con la motilidad, el metabolismo y la fecundación. Su integridad es indispensable para la supervivencia espermática (Bailey et al., 2000). Las pruebas de integridad de membrana permiten identificar daños subletales que pueden pasar inadvertidos mediante evaluaciones convencionales de motilidad y viabilidad (Graham, 2001).

4.7.5 Morfología espermática.

La evaluación morfológica permite identificar anomalías estructurales de cabeza, pieza intermedia y cola. Defectos morfológicos severos suelen asociarse con reducción de la fertilidad y menor resistencia a la criopreservación (Barth y Oko, 1989). Las alteraciones pueden clasificarse como primarias o secundarias dependiendo de su origen durante la espermatogénesis o durante el tránsito epididimario y procesamiento seminal (Chenoweth, 2005).

4.7.6 HOST (Hypoosmotic Swelling Test).

La prueba hiposmótica o HOST evalúa la funcionalidad de la membrana plasmática mediante la capacidad del espermatozoide para responder a cambios osmóticos. Los espermatozoides con membranas funcionales presentan enrollamiento de la cola cuando son expuestos a soluciones hipotónicas (Jeyendran et al., 1984). El HOST ha demostrado una elevada correlación con la fertilidad y con la capacidad de los espermatozoides para resistir los procesos de congelación y descongelación. Por ello se utiliza ampliamente en investigaciones relacionadas con criopreservación seminal bovina (Revell & Mrode, 1994).

4.8 Criopreservación.

La crio preservación de semen es una técnica ampliamente utilizada en tecnologías de reproducción asistida (TRA) tanto en humanos como en animales. A lo largo de las últimas cinco décadas, ha sido una herramienta clave para mejorar la genética del ganado bovino, tanto de carne como de leche. Además, ayuda a prevenir la transmisión de enfermedades venéreas y facilita el manejo reproductivo (Khalil et al., 2017).

En la criopreservación seminal, se somete primero a un periodo de enfriamiento a 4°C durante aproximadamente de 2 a 3 horas. Posteriormente, se envasa en pajuelas de 0,25 ml y se almacena en nitrógeno líquido, lo que permite su conservación durante largos periodos. En este proceso, los factores mas importantes para preservar el semen a largo plazo y mantener su calidad son el enfriamiento controlado, la incorporación de crioprotectores y la congelación en nitrógeno líquido (Bustani y Baiee 2021).

La evaluación de la calidad de semen es esencial para los programas de inseminación artificial, asegurando que el esperma mantenga su capacidad de fertilizar después de ser congelado. Se intenta desarrollar un análisis seminal que pueda predecir de manera eficaz la fertilidad de una muestra. Para ello, se examinan aspectos como el volumen, la concentración, la motilidad y la morfología del semen fresco, mientras que en el semen descongelado se evalúan el vigor y la motilidad progresiva. Estos factores ayudan a determinar la fertilidad potencial del toro y su relación con las técnicas de crio preservación, la finalidad de l dilución y refrigeración

del semen es conservar la viabilidad de los espermatozoides durante un periodo de 2 a 4 días (Calle et al., 2025).

Es esencial contar con una producción ganadera eficaz para asegurar la disponibilidad de alimentos a la sociedad y aumentar la rentabilidad para los productores. En este contexto, la ganadería bovina ha experimentado una intensa selección para conservar los ejemplares más destacados en cuanto rendimiento, apariencia y genética. Actualmente, la mayoría de las técnicas reproductivas en bovinos dependen de la inseminación artificial (IA), lo que requiere conservar los gametos masculinos desde el momento de la eyaculación hasta la inseminación. Debido a que el espermatozoide no puede mantenerse viable por periodos prolongados a temperaturas superiores a 0°C, la criopreservación se ha consolidado como el método más efectivo y ampliamente utilizado para conservar el semen bovino (Ribas et al., 2024).

4.9 Efecto de la criopreservación.

Durante la criopreservación del semen, suelen generarse daños causados por la formación de cristales de hielo, cambios osmóticos bruscos y estrés oxidativo. Estos factores alteran negativamente la movilidad de los espermatozoides, disminuyen la viabilidad y alteran la integridad de sus membranas. En particular, el estrés oxidativo reduce la calidad del semen al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y promover daños en los lípidos durante el almacenamiento en frío (Navarrete et al., 2025).

La criopreservación puede causar daños en los espermatozoides, lo que conduce a una reducción en su movilidad, integridad de sus membranas, el estado del acrosoma y su capacidad fertilizadora en general. Estos efectos repercuten de manera notable la tasa de concepción con semen que ha sido congelado y luego descongelado, las cuales son inferiores en comparación con las obtenidas con semen fresco, un problema ampliamente reconocido en la ganadería bovina. Por esta razón, para lograr los niveles de fertilización similares a los de la inseminación artificial con semen fresco, suele ser necesario utilizar una mayor cantidad de espermatozoides cuando se emplea semen sometido a la criopreservación (Keller et al., 2026).

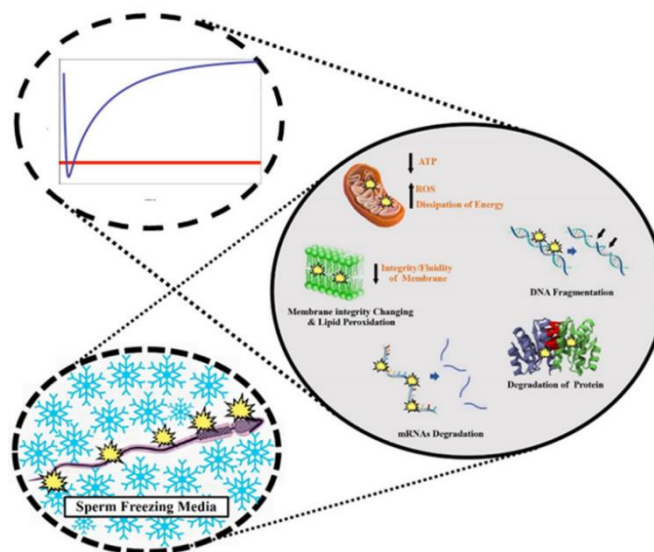


Figura 1 Lesiones en la membrana plasmática del espermatozoide (Sharafi et al., 2022).

Aunque el daño en el ADN del espermatozoide no siempre impide que fecunde al ovocito, la integridad de ese material genético si es clave para que el desarrollo del embrión ocurra de manera normal (Boe-Jansen et al., 2018).

La criopreservación se ha utilizado durante más de cien años, los métodos actuales logran que solo cerca del 50 % de los espermatozoides mantengan su viabilidad tras el proceso. Esta reducción se debe al daño sufrido en varios componentes del espermatozoide, como la membrana plasmática, el núcleo, las mitocondrias, proteínas, los ARNm y los microARN (Hernández et al., 2025).

4.10 Crioprotectores y diluyentes

Los diluyentes seminales que se utilizan con mayor frecuencia incluyen yema de huevo, leche descremada líquida o en polvo o la mezcla de ambas, debido a que proporcionan lipoproteínas esenciales para proteger la membrana espermática y conservar su estabilidad durante la congelación y la descongelación (Crespilho et al., 2012)

La incorporación de yema de huevo de gallina (EY) en los diluyentes basados en Tris-glicerol (TG) es crucial para la criopreservación del semen en bovinos. Se ha demostrado que la yema juega un papel importante en la conservación de la funcionalidad y fertilidad de los espermatozoides, tanto cuando se almacenan en estado líquido como después de ser congelados. En particular la fracción de lipoproteínas de baja densidad contenida en la yema protege a los espermatozoides frente a los daños provocados por la congelación, al evitar la pérdida de lípidos en sus membranas, lo que es vital para mantener su integridad y capacidad de fertilización (Srivastava et al., 2013).

La criopreservación, aunque útil, puede dañar membrana, el acrosoma, la movilidad y viabilidad de los espermatozoides debido a los daños estructurales y funcionales irreversibles. Para minimizar estos efectos, se usan diluyentes y sustancias crioprotectores, estabilizantes y antioxidantes. En bovinos, la yema de huevo se emplea comúnmente por su capacidad para proteger a los espermatozoides contra el choque térmico durante la congelación (Montoya et al., 2020).

4.11 Estrés oxidativo durante el congelamiento y descongelamiento.

El estrés oxidativo (EO) tiene un papel central en la fisiopatología de la mayoría de los sistemas biológicos. En el caso de los espermatozoides, los primeros reportes sobre la toxicidad del oxígeno señalaron que, en condiciones *in vitro*, el incremento de O₂ en el líquido seminal aceleraba la pérdida de motilidad espermática. A partir de ello, se propuso que el peróxido de hidrógeno, producido por las células a partir del oxígeno, era el verdadero responsable de ese efecto tóxico (Bollwein y Bittner 2018).

La evaluación del semen bovino descongelado no debe basarse únicamente en la motilidad y la viabilidad espermática, aunque los parámetros son esenciales por su asociación con la fertilidad y con el desempeño de la inseminación artificial. Para determinar con mayor precisión la capacidad fecundante, también es necesario considerar variables funcionales adicionales, entre ellas la actividad de las mitocondrias y el nivel de estrés oxidativo (Nguyen et al., 2025).

El estrés oxidativo aparece cuando la producción de especies reactivas de oxígeno supera la capacidad antioxidante del organismo para controlarlas. En este contexto, el plasma seminal desempeña una función protectora esencial, ya que posee una amplia variedad de antioxidantes que te ayudan a neutralizar los radicales libres y a preservar la integridad de los espermatozoides. Este sistema de defensa está conformado por antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa, además de compuestos no enzimáticos, como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, el glutatión, la lactoferrina y la albumina (Unal y Uysal, 2024).

4.12 La centrifugación previa al congelado.

Existen diferentes técnicas para escoger espermatozoides con mejores cualidades dentro de una muestra seminal. Una de ellas es la centrifugación de capa única (SLC), procedimiento que a podido aislar espermatozoides más resistentes en varias especies, entre ellas los toros bovinos. Se observó que la técnica de centrifugación de capa única (SLC) permitió obtener espermatozoides con mayor estabilidad de la cromatina, evidenciada por un menor grado de fragmentación del ADN en comparación con las muestras de control, es decir aquellas que no fueron sometidas a centrifugación, además presentaron una proporción mas alta de espermatozoides con elevado potencial de membrana mitocondrial (Lima-verde et al., 2022).

Diversas investigaciones han señalado que el uso de técnicas de centrifugación con percoll puede favorecer algunos parámetros de calidad de los espermatozoides bovinos. Sin embargo, todavía es necesario profundizar en este procedimiento como afecta específicamente las distintas estructuras del espermatozoide y sus características de movimiento (Oliveira et al., 2012).

La centrifugación coloidal es una técnica utilizada para seleccionar espermatozoides de mejor calidad en distintas especies. La centrifugación de capa una o SLC, emplea un coloide específico para cada especie y en bovinos ha mostrado beneficios al mejorar características como motilidad, viabilidad e integridad espermática (Nongbua et al., 2020).

La centrifugación en gradiente (DCG) es una técnica que ayuda a separar los espermatozoides de acuerdo a su densidad, gracias a este proceso es posible recuperar aquellos que presentan mejor movimiento, buena forma y mayor viabilidad, los espermatozoides sanos suelen concentrarse en el pellet mientras que las células dañadas, muertas y otros residuos quedan separados. En toros, medios como percoll han sido utilizados para mejorar la selección espermática (Duma et al., 2025).

La centrifugación de capa única surgió como una técnica para mejorar la calidad seminal al seleccionar los espermatozoides con mejores características del eyaculado. Con el tiempo este método se ha ajustado para distintas especies y volúmenes de semen, también ha demostrado ayudar a reducir la presencia de bacterias en semen de semental, verraco, perro sin embargo en toros aun no se ha evaluado (Cojkic et al., 2024).

4.13 Fertilidad del semen congelado.

La fertilidad constituye el parámetro final que determina el valor biológico y comercial de una dosis seminal. Aunque numerosos indicadores de laboratorio permiten evaluar la calidad espermática, el objetivo principal de cualquier programa de criopreservación es mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides después del proceso de congelación y descongelación. En bovinos, la fertilidad del semen congelado se expresa generalmente mediante tasas de preñez, tasa de no retorno al estro o número de servicios por concepción (Amann & Hammerstedt, 1993; DeJarnette et al., 2004). La introducción de la criopreservación revolucionó los programas de inseminación artificial bovina al permitir el almacenamiento y

distribución mundial de material genético. Sin embargo, la fertilidad obtenida con semen congelado suele ser inferior a la observada con semen fresco debido a los múltiples daños celulares inducidos por el proceso de congelación. Se estima que únicamente entre el 40 y el 60 % de los espermatozoides sobreviven funcionalmente a la criopreservación, dependiendo del toro, el diluyente utilizado y el protocolo de congelación empleado (Watson, 2000; Vishwanath & Shannon, 2000). Uno de los principales desafíos de la criobiología espermática es que los espermatozoides aparentemente viables después de la descongelación pueden presentar alteraciones funcionales que no son detectadas mediante evaluaciones convencionales. Por ejemplo, un espermatozoide puede conservar motilidad progresiva, pero presentar daño en el ADN, alteraciones mitocondriales o defectos en la membrana acrosomal que limiten su capacidad para fecundar un ovocito (Graham, 2001; Amann & DeJarnette, 2012). La fertilidad del semen congelado depende en gran medida de la capacidad de los espermatozoides para completar exitosamente una serie de eventos fisiológicos dentro del tracto reproductor femenino. Estos eventos incluyen transporte espermático, capacitación, hiperactivación, reacción acrosomal, penetración de la zona pelúcida, fusión con el ovocito y desarrollo embrionario temprano. Cualquier alteración en alguno de estos procesos puede reducir significativamente las tasas de concepción (Hunter, 2012).

Diversos estudios han demostrado que existe una considerable variabilidad individual en la capacidad de congelación entre toros. Algunos sementales son considerados “buenos congeladores” debido a que mantienen elevados porcentajes de motilidad y fertilidad después de la descongelación, mientras que otros presentan

una marcada susceptibilidad al daño criogénico. Esta variabilidad está influenciada por factores genéticos, composición de membranas, contenido antioxidante y características bioquímicas del plasma seminal (Purdy, 2006; Murphy et al., 2018). La composición lipídica de la membrana plasmática desempeña un papel fundamental en la resistencia a la criopreservación. Los espermatozoides bovinos contienen elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales proporcionan flexibilidad a la membrana, pero también incrementan su susceptibilidad a la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno (Aitken y Baker, 2006). Otro factor determinante de la fertilidad es la integridad del acrosoma. Esta estructura contiene enzimas hidrolíticas esenciales para la penetración de la zona pelúcida. Durante la congelación pueden ocurrir lesiones acrosomales irreversibles que comprometen la capacidad fecundante incluso cuando los espermatozoides conservan motilidad aparentemente normal (Bailey et al., 2000). La fertilidad también está estrechamente relacionada con la funcionalidad mitocondrial. Las mitocondrias suministran la energía necesaria para el movimiento espermático mediante la producción de ATP. Alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial pueden reducir la motilidad progresiva y limitar la capacidad de los espermatozoides para alcanzar el sitio de fecundación (Amann & Hammerstedt, 2002). Actualmente se reconoce que la evaluación integral de la fertilidad debe incluir parámetros funcionales avanzados como integridad del ADN, potencial mitocondrial, estado oxidativo, citometría de flujo y análisis computarizado de movimiento. Estas herramientas permiten predecir con mayor precisión el comportamiento reproductivo del semen congelado (Kumaresan et al., 2017).

En toros Charoláis, cuya genética posee un elevado valor económico para la producción de carne, la optimización de la fertilidad del semen congelado constituye una prioridad para los programas de mejoramiento genético. En este contexto, la centrifugación previa al congelado podría representar una estrategia para incrementar la calidad seminal posdescongelación mediante la reducción de componentes perjudiciales presentes en el plasma seminal (Murphy et al., 2018).

4.14 Daño mitocondrial durante la criopreservación.

Las mitocondrias son organelos esenciales localizados en la pieza media del espermatozoide. Su principal función consiste en la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, proceso indispensable para sostener la motilidad y la capacidad fecundante de los gametos masculinos (Piomboni et al., 2012). Durante la criopreservación, las mitocondrias constituyen uno de los principales blancos del daño celular inducido por bajas temperaturas. Los cambios osmóticos, la formación de cristales de hielo y el estrés oxidativo alteran la estructura y función mitocondrial, comprometiendo la producción energética necesaria para la supervivencia espermática (Watson, 2000). La membrana mitocondrial interna contiene proteínas especializadas que participan en la cadena de transporte de electrones. La congelación puede modificar la organización de estas proteínas y alterar el gradiente electroquímico responsable de la síntesis de ATP. Como consecuencia, disminuye la disponibilidad energética para el movimiento flagelar (Koppers et al., 2008). Uno de los principales indicadores de funcionalidad mitocondrial es el potencial de membrana mitocondrial. Este parámetro refleja la capacidad de las mitocondrias para generar energía y mantener un metabolismo adecuado.

Numerosos estudios han demostrado que la disminución del potencial mitocondrial después de la descongelación se correlaciona negativamente con la fertilidad (Kasai et al., 2002). La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno representa otro mecanismo importante de daño mitocondrial. Durante el estrés térmico asociado a la criopreservación se incrementa la fuga de electrones desde la cadena respiratoria, favoreciendo la generación de radicales libres altamente reactivos (Aitken et al., 2012). Aunque niveles moderados de especies reactivas de oxígeno participan en procesos fisiológicos como capacitación y reacción acrosomal, concentraciones elevadas provocan daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y ADN espermático. Este fenómeno es particularmente importante en bovinos debido al elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares (Agarwal et al., 2014). La peroxidación lipídica constituye una de las principales consecuencias del daño oxidativo mitocondrial. Este proceso genera productos tóxicos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, los cuales alteran la fluidez de membrana y reducen la viabilidad celular (Lenzi et al., 2002). Las alteraciones mitocondriales también pueden activar vías apoptóticas similares a las observadas en células somáticas. Aunque los espermatozoides poseen una maquinaria apoptótica limitada, se ha demostrado que el daño mitocondrial puede inducir liberación de factores proapoptóticos y acelerar la muerte celular programada (Sakkas et al., 2002). Diversas investigaciones han reportado correlaciones positivas entre el potencial mitocondrial y parámetros seminales convencionales como motilidad progresiva, viabilidad e integridad de membrana. Esto confirma la importancia de la función mitocondrial como predictor de fertilidad masculina (Celeghini et al., 2007).

La centrifugación previa al congelado podría influir indirectamente sobre la función mitocondrial mediante la eliminación parcial de componentes del plasma seminal capaces de favorecer el estrés oxidativo. Sin embargo, una centrifugación excesiva también puede generar daño mecánico y aumentar la producción de radicales libres, por lo que resulta indispensable determinar protocolos óptimos para cada especie y raza bovina (Hoogewijs et al., 2012). En años recientes, la evaluación del potencial mitocondrial mediante citometría de flujo utilizando fluorocromos como JC-1, Rhodamine 123 y MitoTracker se ha convertido en una herramienta fundamental para estudiar los efectos de diferentes protocolos de procesamiento seminal sobre la funcionalidad espermática posdescongelación (Celeghini et al., 2007).

4.15 Fragmentación del ADN espermático.

La integridad genética de los espermatozoides constituye uno de los factores más importantes para el éxito reproductivo. Aunque durante muchos años la evaluación seminal se centró principalmente en parámetros convencionales como motilidad y viabilidad, actualmente se reconoce que la calidad del ADN espermático tiene una influencia directa sobre la fertilización, el desarrollo embrionario y la supervivencia fetal (Evenson y Wixon, 2006). El ADN espermático presenta una organización altamente especializada caracterizada por un elevado grado de condensación. Durante la espermiogénesis, las histonas nucleares son reemplazadas por protaminas, permitiendo una compactación extrema de la cromatina. Esta estructura proporciona protección frente a daños físicos, químicos y oxidativos (Oliva, 2006).

A pesar de estos mecanismos protectores, el ADN puede sufrir alteraciones durante diferentes etapas del proceso reproductivo. Entre las principales causas de

fragmentación se encuentran defectos en la espermatogénesis, estrés oxidativo, envejecimiento celular, enfermedades reproductivas y procedimientos de conservación seminal (Sakkas y Álvarez, 2010). La criopreservación constituye una fuente importante de daño genético. Durante la congelación se generan especies reactivas de oxígeno capaces de atacar directamente las bases nitrogenadas y provocar rupturas de cadena simple o doble en el ADN. Estas lesiones pueden comprometer la capacidad de desarrollo embrionario aun cuando la fecundación ocurra exitosamente (Aitken & De Iuliis, 2010). Diversos estudios han demostrado que existe una relación negativa entre la fragmentación del ADN y la fertilidad. Incrementos en el índice de fragmentación espermática se asocian con menores tasas de concepción, reducción del desarrollo embrionario y aumento de pérdidas gestacionales tempranas (Evenson et al., 2002). En bovinos, la integridad del ADN adquiere especial relevancia debido al uso masivo de semen congelado en programas de inseminación artificial. La difusión de material genético proveniente de toros élite implica que alteraciones genómicas pueden afectar a un gran número de descendientes y generar importantes pérdidas económicas (Amann & DeJarnette, 2012). Actualmente existen diversas técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático. Entre las más utilizadas se encuentran SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), ensayo Cometa y prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD) (Evenson & Wixon, 2006). El ensayo SCSA es considerado uno de los métodos más utilizados debido a su elevada reproducibilidad y capacidad para analizar miles de células en pocos segundos mediante citometría de flujo. Esta técnica permite calcular el índice de fragmentación del ADN, parámetro

ampliamente utilizado en estudios de fertilidad masculina (Evenson et al., 2002). La técnica TUNEL detecta directamente rupturas de ADN mediante el marcaje de extremos libres generados por fragmentación. Diversos trabajos han demostrado que esta metodología presenta una elevada sensibilidad para identificar daños genéticos inducidos por criopreservación (Sharma et al., 2013). La fragmentación del ADN también se relaciona estrechamente con el daño mitocondrial y el estrés oxidativo. Cuando la producción de especies reactivas de oxígeno supera la capacidad antioxidante celular, se genera una cascada de eventos que afecta simultáneamente membranas, mitocondrias y material genético (Aitken et al., 2012). En el contexto de la centrifugación previa al congelado, la eliminación parcial del plasma seminal puede tener efectos duales. Por un lado, podría reducir componentes que favorecen la producción de radicales libres; por otro, también puede eliminar antioxidantes naturales presentes en el plasma seminal. Por esta razón, la evaluación de la fragmentación del ADN resulta indispensable para determinar el verdadero impacto de la centrifugación sobre la calidad seminal posdescongelación (Murphy et al., 2018).

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología de la Reproducción (CBR) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna (UAAAN-UL), ubicada en Torreón, Coahuila, México (25°30'17" N, 103°20'41" O; 1,120 m s.n.m.). La región presenta un clima semiárido, caracterizado por una precipitación media anual de 224 a 245 mm y temperaturas extremas típicas del norte de México.

5.2. Animales experimentales

Se utilizaron dos toros de raza Charolais, clínicamente sanos, sexualmente maduros y con edades comprendidas entre 2 y 3 años. Los animales presentaron una condición corporal promedio de 4.0 (escala de 1 a 5) y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación y sanidad durante todo el periodo experimental. Todos los procedimientos fueron realizados por personal capacitado, siguiendo las recomendaciones para el manejo ético y bienestar animal con el fin de minimizar el estrés durante la colecta y manipulación del semen.

5.3. Obtención de semen

La colecta seminal se realizó mediante el método de vagina artificial para bovinos. Previamente a cada colecta, se efectuó la limpieza de la región prepucial utilizando agua destilada para reducir el riesgo de contaminación de la muestra. La vagina artificial fue preparada con agua a una temperatura interna de 39–42 °C y lubricada con gel no espermicida.

Los toros fueron previamente entrenados para la monta y la colecta se realizó utilizando un animal de apoyo como estímulo sexual. Antes de la obtención del eyaculado se permitió una falsa monta para incrementar la estimulación sexual. Durante la monta efectiva, el pene fue dirigido cuidadosamente hacia la vagina artificial para la recolección del semen.

Inmediatamente después de la colecta, las muestras fueron protegidas de cambios bruscos de temperatura y trasladadas al laboratorio para su evaluación. Únicamente se utilizaron eyaculados con un volumen mínimo de 4 mL y libres de contaminación visible.

5.4. Evaluación seminal

La evaluación seminal se realizó inmediatamente después de la colecta mediante análisis macroscópicos y microscópicos.

Evaluación macroscópica

Se registró el volumen del eyaculado mediante lectura directa del tubo colector graduado. Asimismo, se evaluaron el color, apariencia, consistencia y pH seminal. Las muestras que presentaron evidencia de contaminación con sangre, orina, materia fecal u otros agentes externos fueron descartadas del estudio.

Evaluación microscópica

Las características microscópicas fueron evaluadas utilizando un microscopio óptico con platina térmica a 37 °C. Se determinaron los siguientes parámetros seminales:

- Motilidad masal (%).
- Motilidad espermática individual (%).
- Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL).
- Viabilidad espermática (%), mediante tinción eosina-negrosina.
- Morfología espermática (% de células normales).
- Integridad funcional de la membrana plasmática (%), mediante la prueba hipoosmótica (HOST).

Todas las evaluaciones fueron realizadas por el mismo operador para reducir la variabilidad asociada al observador.

5.5. Procesamiento y criopreservación seminal

Posteriormente a la evaluación inicial, los eyaculados fueron sometidos a los tratamientos experimentales correspondientes. Las muestras fueron diluidas utilizando un medio crioprotector comercial y procesadas siguiendo los protocolos establecidos para la congelación seminal bovina. Finalmente, el semen fue envasado en pajillas de 0.25 mL, equilibrado, congelado en vapores de nitrógeno líquido y almacenado en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su posterior evaluación posdescongelación.

5.6 Diseño experimental

Se realizaron tres colectas seminales y los eyaculados obtenidos fueron divididos en dos tratamientos experimentales: T1, correspondiente al semen que no fue sometido a centrifugación previa al congelamiento, y T2, correspondiente al semen sometido a centrifugación antes de la criopreservación.

Posteriormente, se tomaron muestras de semen fresco y semen diluido para la elaboración de frotis en laminillas, las cuales fueron teñidas con eosina-negrosina para evaluar la viabilidad espermática. Las muestras del tratamiento T1 fueron diluidas en una proporción 1:1 (v/v), utilizando el mismo volumen de diluyente que de semen colectado. En el tratamiento T2 se siguió el protocolo de centrifugación antes de la dilución.

Las muestras asignadas al tratamiento T2 fueron mantenidas previamente a una temperatura de 32 a 34 °C y posteriormente centrifugadas a 2,800 rpm ($600 \times g$) durante 10 min. Al finalizar la centrifugación, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se conservó únicamente el pellet espermático, el cual fue resuspendido con diluyente en una proporción equivalente a la utilizada en el tratamiento T1.

Una vez ajustadas las muestras a una concentración similar entre tratamientos, se tomaron alícuotas del semen diluido de los grupos T1 y T2 para evaluar la viabilidad espermática mediante tinción eosina-negrosina y la integridad funcional de la membrana plasmática mediante la prueba hipoosmótica (HOST). Asimismo, se determinó la motilidad espermática de cada tratamiento. Estas evaluaciones se realizaron en tres momentos experimentales: semen fresco, semen refrigerado a 5 °C y semen posdescongelado.

5.6.1 Curva de enfriamiento, congelación y descongelación seminal

Después de la dilución y procesamiento de las muestras, estas fueron identificadas de acuerdo con el tratamiento correspondiente y sometidas a una curva de enfriamiento. Para ello, los tubos se almacenaron en refrigeración a 5 °C durante 3 h, permitiendo una disminución gradual de la temperatura y reduciendo el riesgo de daño celular asociado a cambios térmicos bruscos. Este periodo de equilibración fue indispensable para acondicionar los espermatozoides antes del proceso de congelación.

Finalizado el periodo de enfriamiento, el semen fue envasado en pajillas de 0.5 mL. Para cada tratamiento se prepararon 10 pajillas por eyaculado, las cuales fueron selladas utilizando alcohol polivinílico (PVA).

La congelación se realizó mediante exposición controlada a vapores de nitrógeno líquido. Las pajillas fueron colocadas sobre una rejilla suspendida dentro de una hielera de unicel que contenía nitrógeno líquido en el fondo. Inicialmente, las muestras permanecieron durante 15 min expuestas únicamente a los vapores de nitrógeno líquido, sin contacto directo con el líquido criogénico, con la finalidad de evitar daños ocasionados por un choque térmico. Posteriormente, las pajillas fueron sumergidas completamente en nitrógeno líquido (-196 °C) y almacenadas en un termo criogénico hasta su evaluación.

Para la evaluación posdescongelación, las pajillas fueron retiradas del nitrógeno líquido y descongeladas en baño María a 37 °C durante 40 s. Inmediatamente después de la descongelación se determinaron la viabilidad espermática mediante tinción eosina-negrosina y la integridad funcional de la membrana plasmática

mediante la prueba hipoosmótica (HOST). Asimismo, se evaluó la motilidad espermática de cada tratamiento.



Figura 2 Colocación de pajillas en nitrógeno líquido para evitar choque térmico. Variables de repuesta.

1. Concentración espermática
2. Motilidad total
3. Viabilidad por tinción eosina negrosina
4. Prueba HOST para integridad funcional de la membrana



Figura 3 Lectura de laminillas en prueba HOST y tinción eosina negrosina para determinar viabilidad.

5.7 Evaluaciones por duplicado

Cada variable se analizará por duplicado técnico por muestra, para reducir error en observación.

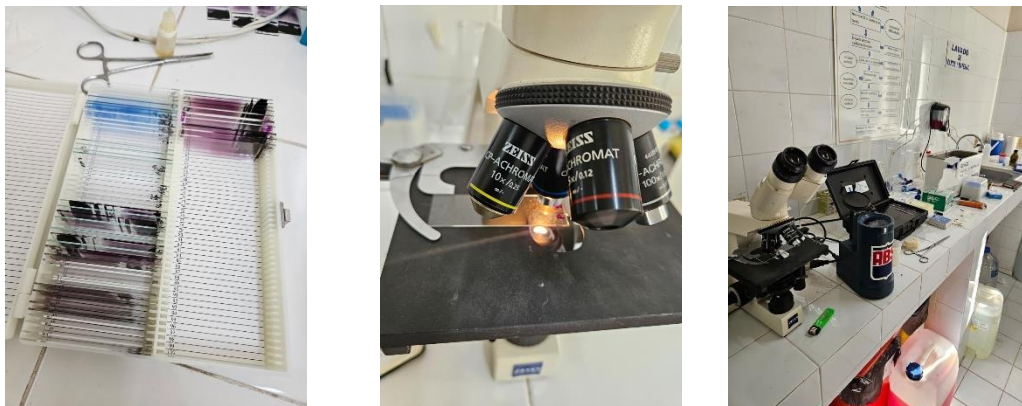


Figura 4 Lectura y clasificación de laminillas

5.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para las variables viabilidad espermática (%), motilidad total (%) e integridad funcional de membrana plasmática (HOST, %) fueron analizados mediante un modelo lineal general utilizando un diseño factorial completamente al azar. Previamente al análisis, se verificaron los supuestos de normalidad de los residuos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Debido a que las variables expresadas en porcentaje cumplieron los supuestos del modelo, los análisis se realizaron utilizando los valores originales.

Para cada variable de respuesta se ajustó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + E_i + G_j + M_k + ID_l + (EG)_{ij} + (EM)_{ik} + (GM)_{jk} + (EGM)_{ijk} + \varepsilon_{ijklm}$$

donde:

- Y_{ijklm} = observación de la variable evaluada (viabilidad, motilidad o HOST);

- μ = media general;
- E_i = efecto fijo de la etapa de procesamiento seminal (Fresco, Refrigerado y Descongelado);
- G_j = efecto fijo del grupo experimental (Centrifugado y No centrifugado);
- M_k = efecto fijo del muestreo (I, II y III);
- ID_l = efecto fijo del toro (identificación individual);
- $(EG)_{ij}$ = interacción etapa $\times$ grupo;
- $(EM)_{ik}$ = interacción etapa $\times$ muestreo;
- $(GM)_{jk}$ = interacción grupo $\times$ muestreo;
- $(EGM)_{ijk}$ = interacción etapa $\times$ grupo $\times$ muestreo;
- ε_{ijklm} = error experimental aleatorio asociado a cada observación.

Los efectos principales y sus interacciones fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Para facilitar la interpretación de los resultados, las diferencias estadísticas entre medias se indicaron mediante letras distintas (a, b, c), considerándose diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$ y tendencias cuando $0.05 < P \leq 0.10$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico R versión 4.4.0 (R Core Team, Vienna, Austria), empleando las librerías stats, car,

emmeans y multcompView para el ajuste de modelos, comparación de medias y asignación de letras de significancia.

VI. RESULTADOS

6.1 Viabilidad espermática

El análisis de varianza mostró que la viabilidad espermática fue afectada significativamente por los factores Etapa ($P = 0.0014$), Grupo ($P = 0.0061$), Muestreo ($P = 0.0010$) e ID ($P = 0.0080$). No se detectaron interacciones significativas entre Etapa $\times$ Grupo, Etapa $\times$ Muestreo, Grupo $\times$ Muestreo ni la interacción triple ($P > 0.05$). La viabilidad disminuyó progresivamente conforme avanzó el procesamiento seminal (Cuadro 1). La etapa Fresco presentó los mayores valores ($77.83 \pm 2.69\%$), seguida de Refrigerado ($72.17 \pm 3.12\%$), mientras que la etapa Descongelado registró la menor viabilidad ($63.83 \pm 3.59\%$; $P < 0.05$). No se observaron diferencias entre las etapas Fresco y Refrigerado ($P > 0.05$).

Cuadro 1 Viabilidad espermática (%) por efectos principales

Factor	Nivel	(n)	Media $\pm$ EE
Etapa	Fresco	12	77.83 ± 2.69^a
Etapa	Refrigerado	12	72.17 ± 3.12^a
Etapa	Descongelado	12	63.83 ± 3.59^b
Grupos	Centrifugado	18	75.33 ± 2.71^a
	No		
Grupos	centrifugado	18	67.22 ± 2.73^b
Muestreo	II	12	77.25 ± 2.07^a
Muestreo	I	12	73.50 ± 4.22^a
Muestreo	III	12	63.08 ± 2.65^b
ID	M2	18	75.17 ± 2.44^a
ID	M1	18	67.39 ± 3.01^a

^{a,b}, literales diferentes indica diferencia estadística $p < 0.05$

Respecto al efecto del tratamiento, el grupo Centrifugado presentó una viabilidad superior ($75.33 \pm 2.71\%$) en comparación con el grupo No centrifugado ($67.22 \pm 2.73\%$; $P < 0.05$). En relación con el momento de evaluación, los muestreos I y II mostraron valores similares de viabilidad (73.50 ± 4.22 y $77.25 \pm 2.07\%$,

respectivamente), ambos superiores al muestreo III ($63.08 \pm 2.65\%$; $P < 0.05$). Por otra parte, aunque el factor ID resultó significativo en el modelo general, la comparación múltiple mostró valores promedio similares entre los toros M2 ($75.17 \pm 2.44\%$) y M1 ($67.39 \pm 3.01\%$; Cuadro 1).

6.2 Motilidad espermática

La motilidad fue influenciada significativamente por los factores Etapa ($P < 0.001$), Grupo ($P = 0.022$) e ID ($P = 0.0017$). Sin embargo, el factor Muestreo no presentó efecto significativo ($P = 0.4336$). Tampoco se detectaron interacciones significativas entre los factores evaluados ($P > 0.05$). La principal fuente de variación correspondió a la etapa de procesamiento seminal. Las muestras Frescas y Refrigeradas mostraron porcentajes de motilidad similares ($87.92 \pm 0.96\%$), mientras que la motilidad disminuyó marcadamente después de la descongelación, alcanzando un promedio de $47.08 \pm 4.10\%$ ($P < 0.05$; Cuadro 2).

Cuadro 2 Motilidad (%) por efectos principales

Factor	Nivel	(n)	Media $\pm$ EE
Etapas	Fresco	12	87.92 $\pm$ 0.96a
Etapas	Refrigerado	12	87.92 $\pm$ 0.96a
Etapas	Descongelado	12	47.08 $\pm$ 4.10b
Grupos	Centrifugado	18	77.22 $\pm$ 4.07a
Grupos	No centrifugado	18	71.39 $\pm$ 5.84a
Muestreo	II	12	76.25 $\pm$ 5.58a
Muestreo	I	12	74.17 $\pm$ 6.77a
Muestreo	III	12	72.50 $\pm$ 6.50a
ID	P2	18	78.61 $\pm$ 3.83a
ID	C1	18	70.00 $\pm$ 5.90a

a,b, literales diferentes indica diferencia estadística $p < 0.05$

Aunque el análisis de varianza detectó diferencias entre grupos, las medias generales mostraron una tendencia favorable para el grupo Centrifugado (77.22 $\pm$ 4.07%) respecto al grupo No centrifugado (71.39 $\pm$ 5.84%). Los tres momentos de muestreo presentaron valores semejantes de motilidad, con promedios de 72.50 $\pm$ 6.50%, 74.17 $\pm$ 6.77% y 76.25 $\pm$ 5.58% para los muestreos I, II y III, respectivamente ($P > 0.05$). Asimismo, el toro M2 mostró una motilidad promedio superior (78.61 $\pm$ 3.83%) a la observada en el toro M1 (70.00 $\pm$ 5.90%).

6.3 Integridad funcional de membrana (HOST)

Para la prueba HOST se observaron efectos significativos de Etapa ($P = 0.0001$), Grupo ($P = 0.0008$) y Muestreo ($P = 0.0038$). El factor ID no influyó sobre esta variable ($P = 0.7018$). Adicionalmente, se detectó una interacción significativa entre Etapa $\times$ Muestreo ($P = 0.0129$), indicando que el comportamiento de la integridad de membrana a través de las etapas dependió del momento de evaluación. No se observaron efectos de las demás interacciones ($P > 0.05$).

La integridad funcional de membrana disminuyó conforme avanzó el procesamiento seminal. Las etapas Fresco ($69.33 \pm 3.07\%$) y Refrigerado ($64.21 \pm 2.15\%$) presentaron valores similares, pero superiores a los observados en la etapa Descongelado ($57.04 \pm 1.47\%$; $P < 0.05$, Cuadro 3).

Cuadro 3 HOST (%) por efectos principales

Factor	Nivel	(n)	Media $\pm$ EE
Etapas	Fresco	12	69.33 ± 3.07^a
Etapas	Refrigerado	12	64.21 ± 2.15^a
Etapas	Descongelado	12	57.04 ± 1.47^b
Grupos	Centrifugado	18	67.00 ± 2.08^a
Grupos	No centrifugado	18	60.06 ± 2.06^b
Muestreo	II	12	67.71 ± 3.00^a
Muestreo	I	12	63.50 ± 2.47^a
Muestreo	III	12	59.38 ± 2.20^a
ID	P2	18	63.86 ± 2.26^a
ID	C1	18	63.19 ± 2.21^a

^{a,b}, literales diferentes indica diferencia estadística $p < 0.05$

El grupo Centrifugado presentó una mayor proporción de espermatozoides con membrana funcionalmente íntegra ($67.00 \pm 2.08\%$) que el grupo No centrifugado ($60.06 \pm 2.06\%$; $P < 0.05$). Los tres muestreos evaluados mostraron valores comparables de HOST (67.71 ± 3.00 , 59.38 ± 2.20 y $63.50 \pm 2.47\%$ para los muestreos I, II y III, respectivamente), aunque el modelo estadístico identificó diferencias globales asociadas a este factor. No se encontraron diferencias entre los toros evaluados, con promedios de $63.86 \pm 2.26\%$ para M2 y $63.19 \pm 2.21\%$ para M1.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la calidad seminal disminuyó progresivamente conforme avanzó el proceso de criopreservación, observándose reducciones significativas en la viabilidad, motilidad e integridad funcional de membrana después de la congelación-descongelación. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en bovinos y se atribuye principalmente al estrés físico, osmótico y oxidativo que sufren los espermatozoides durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación (Morrell y Mayer, 2017; Yeste, 2016).

La disminución de la viabilidad observada en la etapa posdescongelación coincide con numerosos estudios que describen que entre el 30 y 50% de los espermatozoides bovinos pueden sufrir daño irreversible durante la criopreservación (Purdy, 2006; Watson, 2000). Durante la congelación se forman cristales de hielo extracelulares que incrementan la concentración de solutos en el medio, generando un flujo osmótico de agua desde el interior celular hacia el exterior. Este fenómeno provoca deshidratación celular, alteraciones estructurales de la membrana plasmática y daño a organelos esenciales para la supervivencia espermática (Watson, 2000).

Además, la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos contiene elevadas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente docosahexaenoico y araquidónico, que confieren fluidez a la membrana pero simultáneamente aumentan su susceptibilidad a la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la criopreservación (Aitken y Drevet, 2020). Como consecuencia, se produce pérdida de integridad

estructural, alteración de receptores de membrana y muerte celular, reflejándose en la reducción de la viabilidad observada en este estudio.

La similitud encontrada entre las etapas fresco y refrigerado sugiere que el protocolo de enfriamiento utilizado permitió una adecuada adaptación de los espermatozoides a temperaturas bajas sin generar un daño importante durante la fase de refrigeración. Diversos autores han señalado que la mayor proporción de lesiones ocurre durante la transición entre 0 y -60°C , etapa considerada crítica para la supervivencia celular (Yeste, 2016; Medeiros et al., 2002).

Uno de los hallazgos más importantes fue la mayor viabilidad observada en el grupo centrifugado. Fisiológicamente, este resultado puede explicarse por la eliminación parcial del plasma seminal antes de la congelación. El plasma seminal contiene proteínas, enzimas y componentes metabólicos que son esenciales para la función espermática in vivo; sin embargo, durante la criopreservación algunos de estos componentes pueden favorecer procesos deletéreos sobre la membrana espermática (Manjunath et al., 2007).

Particularmente, las proteínas BSP (Binder of Sperm Proteins) presentes en el plasma seminal bovino se unen a los fosfolípidos de la membrana espermática y promueven la salida de colesterol y fosfolípidos. Aunque este proceso es necesario durante la capacitación espermática, una exposición prolongada durante la conservación seminal puede generar una desestabilización excesiva de la membrana y aumentar la susceptibilidad al choque térmico (Manjunath et al., 2007; Plante et al., 2015).

La centrifugación permite reducir la concentración de estas proteínas y disminuir su efecto negativo durante el almacenamiento, favoreciendo la conservación de la integridad celular. Resultados similares han sido reportados por Murphy et al. (2018), quienes observaron que la remoción parcial del plasma seminal antes de la congelación mejoró la supervivencia espermática y redujo el daño de membrana en toros de alto valor genético.

La motilidad fue la variable más afectada por el proceso de congelación-descongelación, disminuyendo aproximadamente un 40% respecto a las muestras frescas y refrigeradas. Este comportamiento coincide con lo reportado por Amann y Pickett (1987), quienes describieron que la motilidad es uno de los parámetros más sensibles al daño criogénico.

Desde el punto de vista fisiológico, la motilidad depende de la integridad estructural del axonema, de la funcionalidad mitocondrial y de la disponibilidad de ATP. Durante la congelación se producen alteraciones en las membranas mitocondriales que reducen la fosforilación oxidativa y disminuyen la producción energética necesaria para el movimiento flagelar (Gibb & Aitken, 2016).

Asimismo, el estrés oxidativo puede afectar directamente las proteínas del axonema y las proteínas motoras tipo dineína responsables de los movimientos flagelares. La acumulación de ROS genera oxidación de proteínas y pérdida progresiva de la capacidad de movimiento, situación ampliamente descrita en semen bovino criopreservado (Aitken & Drevet, 2020).

La tendencia favorable observada en el grupo centrifugado sugiere que la remoción parcial del plasma seminal contribuyó a reducir el daño oxidativo durante la congelación. Algunos estudios han demostrado que ciertos componentes del plasma seminal pueden actuar como sustratos para la generación de radicales libres durante el almacenamiento prolongado, afectando negativamente la motilidad posdescongelación (Leahy & Gadella, 2011).

La prueba HOST evalúa la capacidad de la membrana plasmática para regular el intercambio osmótico entre el medio extracelular y el interior celular. Por lo tanto, constituye un indicador directo de la funcionalidad de la membrana espermática (Jeyendran et al., 1984).

La disminución observada en la etapa posdescongelación indica que la criopreservación comprometió significativamente la funcionalidad de membrana. Durante la congelación ocurren cambios de fase en los fosfolípidos de membrana que modifican su organización estructural y aumentan la permeabilidad celular (Watson, 2000). Estas alteraciones reducen la capacidad de la membrana para mantener gradientes osmóticos normales y explicarían la menor respuesta observada en la prueba HOST.

El mejor comportamiento del grupo centrifugado respalda nuevamente la hipótesis de que la eliminación parcial del plasma seminal disminuye los procesos de capacitación prematura y estabiliza la membrana durante el almacenamiento. Estudios realizados por Kumaresan et al. (2006) reportaron que la remoción controlada del plasma seminal antes de la criopreservación incrementó

significativamente la integridad de membrana y la supervivencia espermática en bovinos.

La falta de interacciones significativas para la mayoría de las variables sugiere que el efecto de la centrifugación fue consistente a través de las diferentes etapas de procesamiento y momentos de evaluación. Este resultado es relevante porque indica que la respuesta al tratamiento fue relativamente uniforme entre los toros evaluados.

La única interacción significativa detectada correspondió a Etapa × Muestreo para HOST, lo que podría indicar diferencias en la susceptibilidad de la membrana espermática al daño criogénico dependiendo del momento específico de evaluación. Diversos autores han señalado que la resistencia individual de los espermatozoides al estrés osmótico puede variar debido a diferencias en la composición lipídica de la membrana y en la actividad antioxidante intracelular (Pérez-Pé et al., 2001).

Desde una perspectiva reproductiva, los resultados obtenidos sugieren que la centrifugación previa al congelado puede constituir una herramienta útil para mejorar la calidad seminal posdescongelación en toros Charoláis. La preservación de la viabilidad y de la integridad funcional de membrana es fundamental para garantizar procesos posteriores como la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la unión a la zona pelúcida y la fecundación (Yeste, 2016).

Aunque la congelación-descongelación continúa siendo una fuente importante de daño celular, los resultados indican que la eliminación parcial del plasma seminal

antes de la criopreservación puede reducir los efectos negativos asociados al estrés osmótico y oxidativo. En consecuencia, esta estrategia podría contribuir a mejorar el potencial fertilizante del semen criopreservado y aumentar la eficiencia de los programas de inseminación artificial bovina.

VIII.CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la etapa de procesamiento seminal fue el principal factor que afectó la calidad espermática, observándose reducciones significativas en viabilidad, motilidad e integridad de membrana después de la congelación-descongelación. Asimismo, la centrifugación previa al congelado mejoró significativamente la viabilidad y la integridad de membrana, además de mostrar una tendencia favorable sobre la motilidad. Las interacciones entre factores fueron mínimas, detectándose únicamente un efecto significativo de Etapa $\times$ Muestreo para la variable HOST, lo que sugiere una respuesta diferencial de la integridad de membrana a través de las etapas de procesamiento. Estos resultados evidencian que la centrifugación previa al congelado contribuye a preservar la calidad seminal posdescongelación en los toros evaluados.

IX. LITERATURA CITADA

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. **World Journal of Men's Health*, 32*(1), 1–17. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology*, 250*(1–2), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction*, 16*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap059>
- Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2020). The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science*, 220*, 106196. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106196>
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J. R., & Gharagozloo, P. (2012). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development*, 28*(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1071/RD15325>
- Amann, R. P., & DeJarnette, J. M. (2012). Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility. **Theriogenology*, 77*(4), 795–817. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.038>

- Amann, R. P., & Hammerstedt, R. H. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. **Journal of Andrology*, 14*(6), 397–406.
- Amann, R. P., & Hammerstedt, R. H. (2002). Detection of differences in fertility. **Journal of Andrology*, 23*(3), 317–325.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science*, 7*, 145–173.
- Amann, R. P., & Schanbacher, B. D. (1983). Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science*, 57*(Suppl. 2), 380–403.
https://doi.org/10.2527/animalsci1983.57Supplement_2380x
- Andrabi, S. M. H. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals*, 44*(3), 552–569.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01240.x>
- Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., Garcia, A. R., Santos, G. C., Leite, T. G., Oliveira, L. Z., et al. (2015). Morfología del esperma de toros: Interpretación e impacto en la fertilidad. **Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 39*(1), 47–60.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology*, 21*(1), 1–7.

- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1989). **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press.
- Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., & Manjunath, P. (2007). Milk caseins decrease the binding of BSP proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during cryopreservation. **Biology of Reproduction*, 77*(1), 120–126. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058586>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology*, 81*(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Boe-Hansen, G. B., Fortes, M. R. S., & Satake, N. (2018). Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. **Andrology*, 6*(4), 627–633. <https://doi.org/10.1111/andr.12486>
- Bollwein, H., & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. **Animal Reproduction*, 15*(Suppl. 1), 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0041>
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary World*, 14*(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>

Campanholi, S. P., Monteiro, F. M., Ribeiro Dias, E. A., Mercadante, M. E. Z., de Paz, C. C. P., Dell'Aqua Junior, J. A., Papa, F. O., Dell'Aqua, C. P. F., Vantini, R., & Garcia, J. M. (2017). Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. **Theriogenology*, 89*, 114–121.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.008>

Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., & Raphael, C. F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment. **Reproduction in Domestic Animals*, 42*(5), 479–488.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>

Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. **Theriogenology*, 64*(3), 457–468.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.005>

Cojkic, A., Hansson, I., Johannisson, A., Axner, E., & Morrell, J. M. (2024). Single layer centrifugation as a method for bacterial reduction in bull semen for assisted reproduction. **Veterinary Research Communications*, 48*(1), 39–48.
<https://doi.org/10.1007/s11259-023-10178-y>

Colagar, A. H., Marzony, E. T., & Chaichi, M. J. (2009). Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality. **Nutrition Research*, 29*(2), 82–88.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.11.007>

- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology, 13*(1), 130–138. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.97>
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update, 15*(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Crespilho, A. M., Sá Filho, M. F., Dell'Aqua, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A., & Papa, F. O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin-based extenders. *Livestock Science, 149*(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>
- Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147(2), R27–R42. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0420>
- DeJarnette, J. M., Marshall, C. E., Lenz, R. W., Monke, D. R., Ayars, W. H., & Sattler, C. G. (2004). Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(Suppl.), E93–E104. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70065-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70065-3)
- Diskin, M. G., & Kenny, D. A. (2016). Managing the reproductive performance of beef cows. *Theriogenology*, 86(1), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.052>

- Duma, M., Galarza, D. A., Delgado, K., Morocho, A., Bermúdez, G., Soria, M. E., Méndez, M. S., Muñoz-León, E., & Perea, F. P. (2025). Epididymal bull sperm selection by Percoll® density-gradient centrifugation prior to conventional or ultra-rapid freezing enhances post-thaw sperm quality. *Cryobiology*, 118, 105200. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2025.105200>
- Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 23(1), 25–43.
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5), 979–991. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.011>
- Fernandes, C. E., Oliveira, A. R., Miranda, P. A. B., Lopes, S. C. P., Moraes, S. S., Morais, M. G., & Landim-Alvarenga, F. C. (2009). Alterações morfológicas espermáticas em touros de corte com e sem suplementação de zinco na mistura mineral. *Ciência Animal Brasileira*, 10(4), 1074–1083.
- Ferrer, M. S., Hurley, D. J., Palomares, R. A., Bullington, A. C., & Jabur Bittar, J. H. (2017). Optimization of a protocol for cryopreservation of electroejaculated beef bull semen under ambulatory conditions. *Clinical Theriogenology*, 9(4), 563–572.

Foot, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80(Suppl. 2), E1–E10. https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a

Garner, D. L., & Johnson, L. A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using fluorescent probes. *Theriogenology*, 43(1), 135–142. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00091-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00091-2)

Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent developments in spermatozoa cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*, 62(1), 1–8. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-122>

Gloria, A., Carluccio, A., Wegher, L., et al. (2016). Single- and double-layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor-quality ejaculates. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, Article 30. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0088-6>

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

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>

- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2013). *Reproduction in farm animals* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
- Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics*, 11(2), 124–136. <https://doi.org/10.1038/nrg2723>
- Hernández Ballesteros, J. A., Benítez Meza, J. A., Navarrete Méndez, R., Gómez Gurrola, A., & Loya Olguín, J. L. (2025). Efecto del colesterol ligado a ciclodextrinas y antioxidantes en la crioprotección del esperma bovino. *Revista Veritas de Difusión Científica*, 5(3), 1817–1847. <https://doi.org/10.61616/rvdc.v5i3.317>
- Hoogewijs, M. K., Govaere, J. L. F., De Schauwer, C., Dewulf, J., Vandenberghe, L., & Van Soom, A. (2012). Influence of centrifugation on equine semen quality. *Theriogenology*, 77(6), 1189–1197. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.018>
- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, 87(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

- Johnson, L., Varner, D. D., Roberts, M. E., Smith, T. L., Keillor, G. E., & Scrutchfield, W. L. (2000). Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 471–480. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00108-0)
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S., & Hoshi, K. (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential and fertility. *Molecular Human Reproduction*, 8(4), 367–373. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.4.367>
- Keller, A., Keller, E., Vorwald, M., Selsby, J. T., Perry, G., & Kerns, K. (2026). Comparative proteomic analysis of bovine spermatozoa before and after cryopreservation. *Frontiers in Animal Science*. <https://doi.org/10.3389/fanim.2026.1781535>
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2017). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(Suppl. 1), S49–S56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Killian, G. J., Chapman, D. A., & Rogowski, L. A. (1993). Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 49(6), 1202–1207. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.6.1202>
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative

stress in spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 78(5), 809–818.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064514>

Kumaresan, A., Ansari, M. R., & Garg, A. (2006). Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffalo bull semen. *Animal Reproduction Science*, 90(1–2), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.006>

Kumaresan, A., Johannisson, A., Humblot, P., Bergqvist, A. S., & Lundgren, T. (2017). Sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science*, 185, 134–144.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.011>

Leahy, T., & Gadella, B. M. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142(6), 759–778. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0310>

Lenzi, A., Gandini, L., Picardo, M., Tramer, F., Sandri, G., Panfili, E., & Dondero, F. (2000). Lipoperoxidation damage of sperm membrane. *Human Reproduction*, 15(5), 1028–1033.

Lima-Verde, I., Hurri, E., Ntallaris, T., Johannisson, A., Stålhammar, H., & Morrell, J. M. (2022). Sperm quality in young bull semen can be improved by single-layer centrifugation. *Animals*, 12(18), 2435. <https://doi.org/10.3390/ani12182435>

Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., & Fan, J. (2007). Seminal plasma proteins: Functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 217–228.

- Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (1981). Male reproductive function and semen: Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & de Paz, P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(Suppl. 2), 67–78.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Maxwell, W. M. C., & Watson, P. F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1–4), 55–65.
[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01544-0](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01544-0)
- Morrell, J. M., Johannisson, A., Dalin, A. M., Hammar, L., & Sandebert, T. (2009). Single-layer centrifugation with Androcoll™ effectively reduces bacterial contamination in stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 115(1–4), 263–272.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.002>
- Murphy, E. M., Eivers, B., O'Meara, C., Lonergan, P., Fair, S., & Evans, A. C. O. (2018). Effect of reducing seminal plasma volume on sperm quality and fertility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 117, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.020>

- Nichi, M., Bols, P. E. J., Zuge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. M. (2007). Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66(4), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.017>
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. W. (2019). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics* (10th ed.). Elsevier.
- Oliveira, L. Z., Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., de Andrade, A. F. C., Peres, R. F. G., Resende, M. V., & Miguel, M. C. V. (2013). Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics in bulls. *Animal Reproduction Science*, 140(1–2), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.05.008>
- Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209–222. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)
- Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 239–245.

Robaire, B., & Hinton, B. T. (2015). *The epididymis: From molecules to clinical practice*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2925-5>

Rodríguez-Martínez, H. (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 91–101. <https://doi.org/10.1071/RD06112>

Salman, H., Riaz, H., Ahmad, N., Yousaf, M. S., & Khan, M. S. (2023). Effect of seminal plasma removal by centrifugation on post-thaw quality of bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 111, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104111>

Sharafi, M., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., & Esmaeili, V. (2022). Effect of centrifugation protocols on sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology*, 178, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.008>

Senger, P. L. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition* (3rd ed.). Current Conceptions.

Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958–978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>

Sousa, A. P., Tavares, R. S., Velez de la Calle, J. F., Figueiredo, H., Almeida, V., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2011). Dual use of Diff-Quik staining for morphology and viability evaluation of human sperm. *Andrologia*, 43(5), 318–324. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01077.x>

- Surai, P. F. (2006). Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press.
- Ünal, M., & Uysal, O. (2024). The effect of centrifugation on sperm quality and oxidative stress parameters during semen cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science*, 10(2), e1345. <https://doi.org/10.1002/vms3.1345>
- Underwood, E. J., & Suttle, N. F. (1999). The mineral nutrition of livestock (3rd ed.). CABI Publishing.
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 23–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-5)
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-2)
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- Zoca, S. M., Vasconcelos, J. L. M., Pereira, M. H. C., Machado, G. M., & Sa Filho, M. F. (2021). Effects of seminal plasma removal and sperm concentration on fertility of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 170, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.018>