	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ		APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR (ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE (S): ANGIE PAOLA APELLIDO (S): MESA PEINADO

NOMBRE (S): WILLIAM LEONEL APELLIDO (S): CASTAÑO VASQUEZ

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA PECUARIA

DIRECTOR: NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE (S): LEONARDO APELLIDO (S): HERNANDEZ CORREDOR

TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO: DISEÑO DE UN DISPOSITIVO ELECTRÓNICO EXPERIMENTAL DE DESCONGELACIÓN PARA SEMEN BOVINO Y EVALUACIÓN DE SU USO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue diseñar y evaluar un dispositivo electrónico experimental para la descongelación de semen bovino criopreservado y su efecto sobre la calidad espermática sometido a diferentes tasas de calentamiento. Se utilizaron 150 pajillas de toro de la raza Holstein. Las tasas de calentamiento fueron T1: 36°C, T2: 38°C, T3: 40°C, durante 30 segundos en agua y TA1: 36°C, TA2: 38°C, TA3: 40°C, durante 26, 27 y 28 segundos respectivamente en aire. Posdescongelación, se evaluó la movilidad (CASA), la vitalidad (tinción eosina-nigrosina) y morfología (HOST-Tinción Diff-Quick). Se encontraron resultados equivalentes entre tratamientos (agua y aire) para la mayoría de parámetros cinéticos; sin embargo, los tratamientos con agua fueron superiores para los parámetros de MT y MP. En la vitalidad se evidenció una mayor incidencia de espermatozoides viables con la descongelación con aire caliente, no obstante, no se encontraron diferencias entre tratamientos y para la presencia de una morfología normal, se obtuvo en mayor proporción con la descongelación con aire a 40°C, siendo esta superior entre tratamientos. Se concluye que es una alternativa viable la implementación de un dispositivo experimental para la descongelación de pajillas mediante la conducción de calor por aire a diferentes temperaturas y tiempos establecidos.

PALABRAS CLAVES: Descongelación, bovino, aire, dispositivo

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 75 **PLANOS:** ___ **ILUSTRACIONES:** ___ **CD ROOM:** 1

DISEÑO DE UN DISPOSITIVO ELECTRÓNICO EXPERIMENTAL DE
DESCONGELACIÓN PARA SEMEN BOVINO Y EVALUACIÓN DE SU USO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA

WILLIAM LEONEL CASTAÑO VASQUEZ

ANGIE PAOLA MESA PEINADO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA PECUARIA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2022

DISEÑO DE UN DISPOSITIVO ELECTRÓNICO EXPERIMENTAL DE
DESCONGELACIÓN PARA SEMEN BOVINO Y EVALUACIÓN DE SU USO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA

WILLIAM LEONEL CASTAÑO VASQUEZ

ANGIE PAOLA MESA PEINADO

Proyecto de grado modalidad investigación presentado como requisito para optar por el
título de Ingeniero Pecuario

Director:

LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR

Ing. de Producción Animal y Médico Veterinario, Ph.D.

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA PECUARIA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2022

**ACTA DE SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN**

FECHA: 22 de marzo de 2022

HORA: 11:00 a.m.

LUGAR: Sala de juntas Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA PECUARIA

TITULO DEL TRABAJO DE GRADO: "DISEÑO DE UN DISPOSITIVO
ELECTRÓNICO EXPERIMENTAL DE DESCONGELACIÓN PARA SEMEN
BOVINO Y EVALUACIÓN DE SU USO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA"

JURADOS: GIOVANNI MAURICIO BAEZ SANDOVAL
JUAN FRANCISCO BAUTISTA RODRÍGUEZ
CAMILO ERNESTO GUERRERO ALVARADO

DIRECTOR: LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CÓDIGO	CALIFICACIÓN
ANGIE PAOLA MESA PEINADO	1630581	4.3
WILLIAM LEONEL CASTAÑO VASQUEZ	1630582	4.3

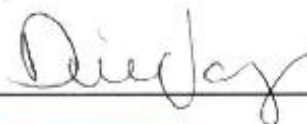
OBSERVACIONES:

APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS:



VoBo. Coordinador Comité Curricular



Agradecimientos

Al concluir esta etapa maravillosa de nuestra vida queremos extender un profundo agradecimiento, a quienes hicieron posible este sueño, aquellos que junto a nosotros caminaron en todo momento y siempre fueron inspiración, apoyo y fortaleza. Esta mención en especial para Dios, nuestros padres y cada uno de los que hicieron parte del proceso. Muchas gracias a ustedes por demostrarme que: *“El verdadero amor no es otra cosa que el deseo inevitable de ayudar al otro para que este se supere”*,

Nuestra gratitud, también a nuestra querida alma mater “UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER”, nuestro agradecimiento sincero al tutor de nuestra Tesis, Dr. Leonardo Hernández Corredor por estar en cada momento de apoyo y dificultad por la que pasamos realizando el trabajo, gracias a cada docente quienes con su apoyo y enseñanzas constituyen la base de nuestra vida profesional.

Tabla de Contenido

Introducción	11
1. El Problema	12
1.1. Título	.12
1.2. Planteamiento del Problema	.12
1.3. Formulación del Problema	13
1.4. Justificación	13
1.5. Objetivos	14
1.5.1. Objetivo General	14
1.5.2. Objetivos Específicos	14
1.6. Delimitaciones	14
1.6.1. Espacial	.14
1.6.2. Temporal	.14
1.6.3. Conceptual	15
2. Marco Referencial	16
2.1. Antecedentes	16
2.2. Marco Teórico	.19
2.2.1. Contexto General de la Producción Bovina en Colombia	.19
2.2.2. Evaluación de Calidad Seminal	.21
2.2.2.1. Concentración Espermática	22

2.2.2.2. Motilidad Espermática	22
2.2.2.3. Vitalidad Espermática	23
2.2.2.4. Morfología Espermática	23
2.2.3. Criopreservación	.24
2.2.4. Crioprotectores	26
2.2.5. Fundamentos del Daño Criogénico Durante la Congelación y Descongelación	29
2.2.6. Efectos causados por la Criopreservación	32
2.2.6.1. Efectos de la Criopreservación sobre la Movilidad	.33
2.2.6.2. Efectos de la Criopreservación sobre la Viabilidad	33
2.2.6.3. Efectos de la Criopreservación sobre la Morfología Espermática	36
2.2.7. Descongelación	.37
2.3. Marco Legal	42
3. Metodología	43
3.1. Tipo de Investigación	.43
3.2. Población y Muestra	.43
3.3. Diseño Estadístico	.43
3.4. Hipótesis	.44
3.5. Variables	44
3.5.1. Variable Independiente	.44

3.5.2. Variables Dependientes	45
3.6. Fases de Investigación	45
3.6.1. Fase Pre-experimental	45
3.6.1.1. Modelo de Descongelación por Aire	45
3.6.1.2. Toma de Temperatura y Tiempo para la Descongelación	46
3.6.2. Fase Experimental	47
3.6.2.1. Evaluación de la Movilidad y Cinemática de los Espermatozoides	47
3.6.2.2. Evaluación de la Vitalidad Espermática	48
3.6.2.3. Evaluación de la Morfología Espermática	48
3.6.2.4. Análisis Estadístico	49
4. Resultados y Discusiones	50
4.1. Efecto sobre la Movilidad y Cinemática Espermática	50
4.2. Efecto en la Vitalidad Espermática	52
4.3. Efecto en la Morfología Espermática	54
5. Conclusiones	56
6. Recomendaciones	57
7. Bibliografía	58

Listado de Figuras

Figura 1 Mapa de distribución de predios bovinos 2021	20
Figura 2 Tasas de enfriamiento y eventos físicos durante la congelación	30
Figura 3 Secador de cabello FKF (110-120V)	45
Figura 4 Termómetro digital Buzzle (32°C-42,9°C)	46
Figura 5 Modelo para el descongelamiento de pajuelas	46
Figura 6 Efecto del protocolo de descongelación sobre la vitalidad espermática	53
Figura 7 Efecto del protocolo de descongelación sobre la morfología espermática	54

Listado de Tablas

Tabla 1	Relación entre factores con las pajillas almacenadas para evaluar la calidad seminal	44
Tabla 2	Tiempo y Nivel empleados para lograr las temperaturas deseadas	47
Tabla 3	Efecto del protocolo de descongelación sobre la movilidad y cinemática espermática	50

Introducción

Para lograr el aumento en la producción, el mejoramiento animal es importante ya que ha contribuido en la optimización de los índices productivos y reproductivos (Hernández-Corredor, 2013).

La inseminación artificial (IA) es una técnica que tiene como fin potencializar el mejoramiento genético en la creciente industria bovina de Colombia (Carrillo-González y Hernández, 2016). Con la técnica del congelamiento del semen se incrementan las posibilidades de utilizar la IA y se facilita el desarrollo de programas tendientes a mejorar esta especie, además la calidad genética de los bovinos se vería acelerada y el costo de la adquisición de sementales sería inferior al necesario, así como al facilitar el transporte de semen a nivel internacional. Esto es principalmente importante en las regiones tropicales (Cueto et al., 2016).

La criopreservación reduce la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides, por lo que la inclusión de elementos para mejorar la supervivencia e integridad de los espermatozoides post-descongelamiento puede resultar en tasas de concepción adecuadas con el uso de la inseminación artificial (Guerrero et al., 2009). Durante el proceso de descongelación se debe utilizar una temperatura óptima y un tiempo adecuado para minimizar la pérdida de calidad del semen, ya que este proceso devuelve nuevamente a los espermatozoides a un estado fisiológico activo (Borah et al., 2015).

El objetivo de este estudio es diseñar un dispositivo de descongelación y evaluar su efecto sobre la viabilidad, motilidad y morfología espermática de semen bovino, sometido a diferentes tasas de calentamiento.

1. El Problema

1.1. Título

DISEÑO DE UN DISPOSITIVO ELECTRÓNICO EXPERIMENTAL DE DESCONGELACIÓN PARA SEMEN BOVINO Y EVALUACIÓN DE SU USO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

1.2. Planteamiento del Problema

En la ganadería bovina, la IA se consolidó a partir del establecimiento del método de fijación cervical, de la aplicación de pequeñas dosis de semen diluido en el cuerpo del útero mediante instrumentación específica, y de la utilización de semen congelado-descongelado. La aplicación de esta biotecnología, conllevó a un mejoramiento sustantivo de la productividad; sin embargo, las fallas en la elección del material genético y en la práctica instrumental, afectan de manera grave los indicadores productivos, bien por detrimento en las tasas fertilidad, o por la diseminación de genes indeseables (Villa-Duque et al., 2016). La baja fertilidad podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación-descongelación

En el proceso de descongelación se debe utilizar una temperatura óptima y un tiempo adecuado para minimizar la pérdida de calidad del semen, ya que este proceso devuelve nuevamente a los espermatozoides a un estado fisiológico activo (Borah et al., 2015). La velocidad a la que se congela la célula debe coincidir con la velocidad de descongelación correspondiente, con el objetivo de revertir el equilibrio osmótico y la rehidratación celular (Shah et al., 2016), evitando lesiones en las células como la recristalización y la hidratación

excesiva, así como el daño a la membrana espermática y al citoplasma, para obtener una adecuada supervivencia celular (Andrabi, 2009; El-Ahwany et al., 2018).

Hoy en día, la mayoría de los centros de inseminación artificial (IA) comerciales recomiendan métodos de descongelación con agua caliente, pero esto ha demostrado que posee sus efectos secundarios perjudiciales en la calidad espermática, por ello de aquí deriva la motivación e innovación de diseñar un dispositivo experimental en el método de descongelación por medio de aire caliente el cual reduzca esos efectos, ya que la producción bovina es la segunda producción más demandada en la región.

1.3. Formulación del Problema

¿La descongelación de semen bovino con un flujo de aire caliente permitirá obtener parámetros de calidad espermática similares o superiores a los obtenidos con la descongelación convencional en agua caliente?

1.4. Justificación

Con la presente investigación se aportará un método novedoso para la descongelación de pajillas mediante la conducción de calor por aire a diferentes temperaturas, que representará una tecnología innovadora para ser utilizada por profesionales tanto en campo como en laboratorios de biotecnología reproductiva, a la vez que brindará un aporte tecnológico en el estudio de calidad seminal y funcionalidad de semen bovino posdescongelación mediante aire.

La importancia de este trabajo radica en la evaluación de la calidad y funcionalidad del semen bovino descongelado mediante el método de aire (dispositivo) y compararlo con el método tradicional de descongelación en agua. Para esto se utilizará varias pruebas de análisis,

para evaluar el efecto de los diferentes métodos y temperaturas de descongelación sobre la movilidad, viabilidad y morfología del semen bovino criopreservado.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Diseñar y evaluar un dispositivo electrónico experimental para la descongelación de semen bovino criopreservado y su efecto sobre la calidad espermática sometido a diferentes tasas de calentamiento.

1.5.2. Objetivos Específicos

Analizar el efecto de una nueva metodología de descongelación con diferentes tasas de calentamiento sobre la movilidad espermática del semen bovino.

Caracterizar los parámetros morfométricos del espermatozoide bovino al someterse a una nueva metodología de descongelación con diferentes tasas de calentamiento.

Determinar el porcentaje de sobrevivencia espermática (vitalidad espermática) al exponerse a una nueva metodología de descongelación con diferentes tasas de calentamiento.

1.6. Delimitaciones

1.6.1. Espacial

Este presente trabajo se realizó con 150 pajillas de semen criopreservado de la raza Holstein, provenientes de la finca La Pajarita ubicada en la vereda El Líbano municipio de Sardinata, Norte de Santander

1.6.2. Temporal

El proyecto tuvo una duración de 3 meses a partir de la aprobación del anteproyecto

1.6.3. Conceptual

Los términos que se tomaron como referencia en la investigación son los siguientes: semen, criopreservación, motilidad espermática, refrigeración, descongelación, bovino, evaluación, espermatozoide, vitalidad espermática, morfología, aire caliente, metodología, dispositivo.

2. Marco Referencial

2.1. Antecedentes

EFFECTO DE LAS VELOCIDADES DE ENFRIAMIENTO, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN Y LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA PRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Autores: Mahadevan, M., & Trounson, A. O.

Los espermatozoides humanos fueron relativamente resistentes al choque por enfriamiento. Sin embargo, cuando el semen diluido se enfrió a más de 10°C por minuto desde la temperatura ambiente (TA) a 5°C y se volvió a calentar a TA, el porcentaje de motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó en comparación con las velocidades de enfriamiento más lentas ($<5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Se encontró que la velocidad de enfriamiento óptima de RT a 5°C que resulta en la supervivencia máxima de los espermatozoides humanos es de 0.5 a 1°C por minuto cuando se enfría de RT a 5°C y posteriormente se congela-descongela en nitrógeno líquido (LN 2). La tasa de congelación óptima de 10°C por minuto, de 5° a -80°C , resultó en una mayor supervivencia de los espermatozoides humanos que velocidades de congelación más lentas ($1.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) o más rápidas ($87.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). La descongelación lenta en aire a 20 o 35°C , en un banco seco, resultó en una mejor supervivencia que los otros métodos de descongelación más lentos o más rápidos utilizados. La temperatura a la que se transfirieron las muestras de semen humano a LN 2 influyó significativamente en la supervivencia de los espermatozoides. La supervivencia fue mayor cuando se transfirió a -30°C o menos en comparación con las muestras transferidas a -15°C o más. Sin embargo, la supervivencia máxima de los espermatozoides se obtuvo cuando las muestras se transfirieron a -

80 ° C o menos. Transferencia de semen humano de LN 2 a -25 a -30 ° C y el almacenamiento durante 24 horas redujo significativamente la viabilidad de los espermatozoides en comparación con el almacenamiento a 196 ° C o -80 a -85 ° C. No se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de almacenamiento de -80 a -85 ° C y -196 ° C en el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides hasta por 90 días.

EL MÉTODO DE DESCONGELACIÓN DE LA PAJA INTERACTÚA CON EL TORO Y EL DILUYENTE PARA INFLUIR EN LA MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS Y LAS TASAS DE CONCEPCIÓN DE LAS VACAS LECHERAS

Autores: DeJarnette, J. M; Marshall C. E.

Se evaluó la influencia de las interacciones del método de descongelación de la paja con el padre y el tipo de diluyente (a base de leche o yema de huevo) sobre la motilidad de los espermatozoides después del descongelamiento y las tasas de concepción de las vacas lecheras. En el experimento 1, los espermatozoides de 10 toros Holstein se congelaron en citrato de yema de huevo y se calentaron extensores de leche entera usando una técnica de eyaculación dividida. Las pajitas se descongelaron en un baño de agua a 37° C con o sin 3 minutos de exposición a una placa de calentamiento a 37° C mientras se envolvían en una toalla de papel (descongelación al aire). El porcentaje de espermatozoides móviles se evaluó después de 1 min y 3 h de incubación a 37° C. En el experimento 2, se congelaron los espermatozoides de 3 toros Holstein en citrato de yema de huevo y un diluyente de leche entera sin calentar usando una técnica de eyaculación dividida. Se descongelaron las pajitas y se evaluó la motilidad como en el experimento 1. Las tasas de concepción (n = 475) se compararon en un solo rebaño de vacas Holstein después de descongelar las pajillas en agua a 35 ° C durante 45 segundos después de descongelarlas con aire

limpiando las pajillas con una toalla de papel al sacarlas del recipiente de almacenamiento y colocarlas directamente en el recipiente. Pistola de inseminación. En cada experimento, las interacciones entre el método de descongelación y el padre, el tipo de extensor o ambos, indicaron que se pueden crear condiciones que faciliten la tolerancia de los espermatozoides a los procedimientos de descongelación con aire. Cuando se detectó un efecto significativo del método de descongelación en cualquiera de los experimentos, el descongelamiento por aire se asoció consistentemente con la menor medida de la motilidad del esperma, la concepción o ambas. En conclusión, aunque algunas combinaciones de padre x extensor parecen ser tolerantes a los procedimientos de descongelación por aire, otras combinaciones son más sensibles, lo que resulta en una reducción de la supervivencia de los espermatozoides después del descongelamiento, las tasas de concepción de las vacas o ambos.

DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA DE CALOR DE ABIERTO Y CERRADO CRYOTOP[®] SISTEMAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CALENTAMIENTO

Autores: Santos, M. V; Sansinena, M; Chirife, J; Zaritzky, N.

El calentamiento de muestras crioconservadas soportadas por dispositivos de pequeño volumen está gobernado por fenómenos de transferencia de calor que se describen matemáticamente mediante la solución de las ecuaciones diferenciales parciales de conducción de calor transitoria; el coeficiente de transferencia de calor por convección (h) es un parámetro importante involucrado en la condición de frontera que está relacionada con el comportamiento dinámico del fluido en el dispositivo de interfaz-fluido de calentamiento (agua, solución de sacarosa o aire). Desafortunadamente, los valores de h para dispositivos de pequeño volumen (es

decir Cryotop®) no se han determinado experimentalmente. Además, los coeficientes de transferencia de calor durante el calentamiento de Cryotop® no se puede obtener a través de correlaciones adimensionales clásicas expresadas en términos de números de Nusselt vs. Reynolds y Prandtl que están disponibles para geometrías regulares y materiales individuales.

El propósito del presente trabajo es determinar los coeficientes de transferencia de calor por convección (h) resolviendo numéricamente la ecuación de transferencia de calor aplicando el método de elementos finitos. Las simulaciones numéricas permitieron predecir los historiales de tiempo-temperatura y las tasas de calentamiento bajo diferentes protocolos en el sistema Cryotop® que se compararon con las tasas de calentamiento de la literatura informadas para este dispositivo. Los valores de h se calcularon considerando la estructura heterogénea del dominio (microgotas, soporte plástico) y la geometría tridimensional irregular. Las condiciones de calentamiento analizadas fueron: a) sistema abierto en contacto con aire y solución de sacarosa a 23 ° C) y b) sistema cerrado en contacto con aire y agua a 23 ° C. Los valores h del Cryotop® sistema abierto sumergido en solución de sacarosa (23 ° C), que según la literatura lograron una supervivencia del orden del 80%, están en el rango de 1800-2200 W / m² K. Los valores de h obtenidos en este trabajo para condiciones de calentamiento son parámetros críticos para los criobiólogos al estudiar la tasa de transferencia de calor en este dispositivo de pequeño volumen.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Contexto General de la Producción Bovina en Colombia

Gracias a su ubicación geográfica, Colombia cuenta con gran variedad de pisos térmicos que van desde el nivel del mar hasta regiones de páramo, esto permite la explotación de diferentes razas bovinas productoras de carne, leche y doble propósito. La población bovina en el país está distribuida en 633.408 predios y totaliza 27.973.390 animales, lo cual representa una

reducción de un 3,4%, respecto a 2020. Al igual que el año anterior, el 68,2% del total de ganado bovino se concentra en los mismos diez departamentos, Antioquia (11,3%), Meta (7,7%), Córdoba (7,6%), Casanare (7,5%), Caquetá (7,4%), Santander (5,9%), Cesar (5,5%), Magdalena (5,3%), Cundinamarca (5,2%), y Bolívar (4,9%).

El número de predios a nivel nacional se redujo en 1,0%, respecto al total de predios del año anterior, y es consistente con la reducción en el número total de cabezas de ganado bovino. De los 633.408 predios en el país, el 70,0% se concentra en diez departamentos del país de Boyacá (14,0%), Cundinamarca (13,1%), Antioquia (10,4%), Nariño (7,3%), Santander (6,7%), Córdoba (5,0%), Tolima (3,9%), Cauca (3,4%), Norte de Santander (3,1%) y Bolívar (3,1%) (ICA, 2021).

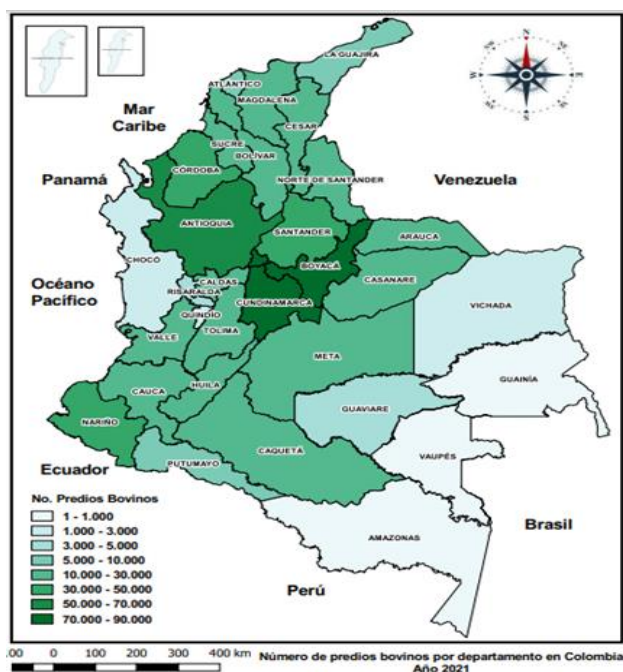


Figura 1 Mapa de distribución de predios bovinos 2021

Nota: Adaptado de *mapa de distribución de predios bovinos 2021*[Fotografía], por Instituto Colombiano Agropecuario, 2018,

(<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018/mapa-no-predios-bovinos-2021.aspx>).

La ganadería bovina, caracterizado por la generación de empleo e impulso al desarrollo social y con una representativa contribución al Producto Interno Bruto –PIB- nacional y agropecuario, carece de políticas agrarias claras y precisas, que busquen orientar el adecuado desempeño de la ganadería, dentro del marco de la sustentabilidad económica y de la sostenibilidad ambiental. De igual forma, la actividad se ha caracterizado por un manejo empírico en el campo de la tecnología, el manejo ambiental, la administración empresarial, la evaluación económica y el encadenamiento con otros sectores productivos y con los consumidores. Esto no ha permitido impulsar los cambios que requiere el sistema ganadero para llegar a ser competitivo y poder enfrentar las actuales y venideras relaciones en el contexto nacional e internacional (Mahecha et al., 2002)

2.2.2. Evaluación de Calidad Seminal

Los análisis para evaluar la calidad seminal deben realizarse a todos los machos que se tengan como reproductores, ya que con este estudio se concluyen parámetros importantes sobre la integridad funcional de espermatozoides (Lossada, 2013).

2.2.2.1. Concentración Espermática. En todo estudio seminal se comienza con el recuento de espermatozoides, dicho proceso se conoce como la evaluación de concentración espermática, en ella se determina el número de células reproductivas masculinas por mililitro de eyaculado, puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen, entre estos métodos destaca la espectrofotometría, Así mismo, es un método indirecto, capaz de medir la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión, que este caso son los espermatozoides (Rodríguez, 2020).

La mayoría de los toros y los de menor talla producen menores volúmenes de semen, la mayoría de toros proporcionan promedios de 5 cc por eyaculado, pero la medida depende de las características del método de colecta, frecuencia de extracción, cantidad de secreción de las glándulas, tiempo de estímulo, estado de salud del toro. Teniendo en cuenta que un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4ml. El volumen puede variar entre 2 y 12ml. El toro eyacula entre 4 a 10 ml de semen con 800 a 2500 millones de espermatozoides por mililitro (Espinosa, 2012).

2.2.2.2. Motilidad Espermática. La motilidad espermática es otro parámetro fundamental para valorar la calidad del eyaculado, consiste en evaluar el movimiento y avance que tienen los espermatozoides dentro de la muestra a analizar, además se clasifican según su progresividad en móviles progresivos, móviles no progresivos, y estáticos. A su vez, se valora la velocidad de movimiento entre rápidos, medios, lentos y estáticos, se concluye por el estudio porcentual que proyecta el sistema de análisis computarizado (Lossada, 2013).

Entre los principales factores que afectan el resultado final están la temperatura del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada, el tiempo que oscila entre la recogida y el análisis, la concentración espermática de la muestra, el diluyente utilizado, posibles patologías

presentes, el tipo de objetivo utilizados y la iluminación del microscopio, los valores de configuración asociados al CASA y el área de las partículas analizadas (Verstegen et al., 2002).

2.2.2.3. Vitalidad Espermática. La viabilidad espermática depende, entre otros factores, de la edad del reproductor, su estado nutricional, la presencia de enfermedades subyacentes, la temperatura ambiental, la estación del año en la que se realiza la extracción seminal y la frecuencia con la que se lleva a cabo dicha extracción (Fischman et al., 2007).

El estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula y es uno de los parámetros más investigados. Además, son numerosos los trabajos de investigación que determinan las diferencias entre los espermatozoides viables y no viables dentro de un eyaculado utilizando esta tinción (Eosina-Nigrosina), conjuntamente con otras técnicas donde los espermatozoides sin tinción están vivos y el espermatozoide con la integridad de la membrana dañada (muerto), se observa de color rosado oscuro. (Zhu & Liu, 2000; Tsakmakidis et al., 2010).

2.2.2.4. Morfología Espermática. Es una herramienta potencialmente valorable para medir las variaciones celulares que influyen en el éxito del semen (Alm et al., 2006; Tsakmakidis et al., 2010). Ya que, pueden presentarse anomalías morfológicas; acrosoma hinchado, cabezas estrechas, microcefálicas y macrocefálicas, consideradas anomalías primarias. De igual manera, las anomalías secundarias; cabeza desprendida, cola doblada, gota citoplasmática distal, se encuentran, sobre todo, en los casos de perturbaciones bioquímicas del plasma seminal.

A su vez, la producción de espermatozoides anormales puede deberse a la edad, problemas nutricionales, enfermedades, factores ambientales (calor, heridas por traumatismos,

sustancias tóxicas, cambio de ambiente), como por razones, hormonales o genéticas (Páez Barón & Corredor Camargo, 2014).

2.2.3. Criopreservación

Los primeros pasos para la criopreservación de espermatozoides de mamíferos surgieron en el siglo XVIII y XIX (Yeste, 2016) no obstante, esta tecnología se desarrolló durante el siglo XX, con el uso de glicerol como agente crioprotector en donde el investigador ruso Ivanov logro inseminar alrededor de 500 yeguas. En 1913, Ivanov descubrió un carnero muerto en la nieve, el semen en estado de congelación contenía espermatozoides vivos y con capacidad fecundante, desde entonces se inició la búsqueda de un método que permitiera mantener el esperma vivo por más tiempo (Großfeld et al., 2008; Díaz y López, 2018). La criopreservación de semen de bovinos se ha implementado desde finales de la década de los años cincuenta (Rosenwaks et al., 2014), y desde entonces se han ido modificando los protocolos de crioconservación con diversos criopreservantes, temperaturas de congelación y diferentes métodos de descongelación (Chatterjee & Gagnon, 2001), para optimizar todo el proceso y obtener mejores resultados en calidad y cinética espermática (Muiño Otero, 2008).

En la actualidad, se han mejorado las técnicas de criopreservación para el almacenamiento criogénico, ampliando la capacidad de almacenar semen de otras especies y una variedad de otros tejidos (Gao & Critser, 2000), por tanto, la disponibilidad de la criopreservación se vuelve prácticamente ilimitada (Sathe & Shipley, 2014)

La respuesta de los espermatozoides a la congelación varía según la especie, siendo el semen bovino uno de los más criotolerantes dentro de las especies domésticas a este proceso (Montoya-Páez et al., 2020). Los principales cambios que ocurren durante el almacenamiento

incluyen la reducción de la motilidad e integridad morfológica del espermatozoide (Dalmazzo Henríquez, 2008). Esto implica que, durante el proceso de crioconservación, los espermatozoides se someten a esfuerzos osmóticos, térmicos y mecánicos, en las etapas de dilución, enfriamiento, equilibrio, congelación y descongelación (Andrabi, 2009; Comizzoli & Wildt, 2013; Doležalová et al., 2017)

La criopreservación causa daños en los espermatozoides como la ruptura irreversible de la membrana plasmática, estrés oxidativo (Ahmed et al., 2019), desnaturalización y pérdida de proteínas y enzimas, daño del ADN, disminución de la vitalidad y funcionamiento de los espermatozoides sobrevivientes al daño criogénico, daños que pueden ser subletales y / o letales (Varghese et al., 2016; Olszewska-Slonina, 2013). El estrés oxidativo se crea cuando la generación celular de radicales libres de oxígeno (ROS) supera estas defensas antioxidantes con daño oxidativo irreversible (Thomson et al., 2009), lo que deteriora la integridad del ADN en el núcleo y la funcionalidad de los espermatozoides (Gibb & Aitken, 2016).

Este proceso induce a la criocapacitación de los espermatozoides con la reacción anormal del acrosoma, lo que comprometería severamente el potencial de fertilización de los espermatozoides (Varner & Johnson, 2007), esto podría ver reflejado en la práctica de la inseminación con afección en las tasas de fertilidad (Quispe, 2018).

Los espermatozoides están rodeados por una sola membrana plasmática, y en su interior hay otras membranas que separan diversos orgánulos de los espermatozoides, incluyendo las mitocondrias (Tapia et al., 2012). Los lípidos de la membrana, como los glicerofosfolípidos (GPL), son muy diversos en diferentes regiones de la membrana y sufren cambios durante la maduración de los espermatozoides, también funcionan como un sistema de almacenamiento de

energía (Oresti et al., 2015). En el espermatozoide, los GPL y la esfingomielina se caracterizan por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga y muy larga (alrededor del 30% de los ácidos grasos son AGPI), que son sensibles al proceso de congelación (Ferreira et al., 2018).

El éxito de la criopreservación del semen depende del mantenimiento de la capacidad de fecundación, que está determinada por la conservación de la movilidad del espermatozoide, la integridad y las funciones de las membranas del espermatozoide (Wolkers & Oldenhof, 2015), en el cual la movilidad de los espermatozoides proporciona información sobre las fuentes de energía de los espermatozoides (Biniová et al., 2018). En una investigación reciente, Treulen et al. (2018) indica que los espermatozoides descongelados desencadenan en una transición de membrana mitocondrial asociado con un aumento de calcio intracelular y la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), disminución de los niveles de ATP y ROS y deterioro de la integridad de la membrana plasmática.

2.2.4. Crioprotectores

El metabolismo celular se reduce cuando las temperaturas son bajas y esto hace posible la preservación a largo plazo de células germinales, embriones y tejidos, para esto, las células deben deshidratarse previamente lo suficiente, lo que normalmente requiere la acción de agentes crioprotectores (CPA) (Gao & Critser, 2000), que protegen a las células de la formación de hielo intracelular, los CPA deben ser capaces de penetrar en las células, ser solubles y tener una baja toxicidad (Wolkers & Oldenhof, 2015); sirven de tampón para ajustar los cambios de pH, el cual debe encontrarse en un nivel óptimo para el espermatozoide siendo este cercano a la neutralidad (6.9 y 7.1) (Agredo Palechor, 2015).

Los crioprotectores pueden clasificarse en dos grupos, los primarios también llamados penetrantes, intracelulares o permeables, que son sustancias de bajo peso molecular (32 a 212 Daltons), generalmente alcoholes, como el glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, etc. Estos crioprotectores se introducen a la célula de forma uniforme, provocando la deshidratación celular por sustitución del agua intracelular, evitando así el incremento de la concentración de solutos ya que reemplaza osmóticamente al agua. Otra característica importante es que disminuyen el punto de congelación del agua; esta característica los hace más efectivo cuando se utilizan bajas tasas de enfriamiento, ya que, de esta forma, ayudan a disminuir la formación de cristales de hielo. (Dalmazzo Henríquez, 2008).

Los crioprotectores secundarios, igualmente conocidos como no penetrantes, extracelulares o no permeables, tienen un alto peso molecular, son proteínas que se encuentran en la yema de huevo, azúcares en la leche, polivinilpirrolidona, glucosa, fructosa, ficol, dextrano, sorbitol, sacarosa, lactosa, trehalosa, rafinosa y otros azúcares. Son más eficaces en caso de enfriamiento rápido, estos compuestos contribuyen a la extracción de agua intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica, sin penetrar en la célula, evitando la formación de grandes cristales de hielo intracelularmente (Singh et al., 2018), Además, no atenúan el “efecto de solución” de la alta concentración intracelular de solutos, por lo tanto, son más efectivos en congelaciones rápidas (Ugarelli et al., 2017). En la mayoría de los casos, los medios de congelación contienen ambos agentes crioprotectores (Benson et al., 2012).

Los crioprotectores más utilizados para la congelación de semen de bovino son el glicerol y la yema de huevo (Montoya-Páez et al., 2020; Rámonez et al., 2017). El glicerol es un polihidroxilado, formador de enlaces de hidrógeno con el agua (H₂O), penetra a través de la membrana celular y no es tóxico durante la exposición celular en concentraciones bajas de 1 a 5

mol/L (menos del 4%) (Rámonez et al., 2017). Por lo general, los CPA se aplican cerca de la congelación, un punto en el que la actividad metabólica es muy baja y menos tóxica (Rosenwaks et al., 2014), por lo que, antes de la congelación en lo que respecta al equilibrio, denominado tiempo de "equilibrio de glicerol", los espermatozoides interactúan con el glicerol teniendo un primer ajuste del volumen celular por la salida del agua, seguido por la penetración lenta del glicerol retornando el volumen celular normal (Shah et al., 2016). En este punto el glicerol fisiológicamente reemplaza el agua intracelular necesaria para el mantenimiento del volumen celular, tiene interacción con iones y macromoléculas y causa una disminución de las concentraciones de electrolitos, de esta manera se reduce el punto de congelación del agua, de modo que se produzca una menor cantidad de hielo a temperaturas bajas (Andrabi, 2009).

Cuando la temperatura desciende por debajo de 0°C sin la presencia de crioprotectores, los fluidos acuosos celulares se enfrían excesivamente, un estado inestable que posteriormente termina con el rápido crecimiento de cristales de hielo en forma de núcleos en el espacio extracelular, posteriormente se forman cristales de hielo en el espacio intracelular (Rosenwaks et al., 2014). Los CPA evitan la formación excesiva de cristales de hielo intracelular que no sólo depende de la velocidad de enfriamiento y la temperatura, sino también de concentración de CPA (Yeste, 2016).

La yema de huevo contiene un componente activo lipoproteico de baja densidad (LDL) que recubre la superficie del espermatozoide durante la congelación y la descongelación, bloqueando la entrada de los iones de calcio a la célula. Protege a los espermatozoides contra el shock frío (factor de resistencia), además confiere protección en la congelación y la descongelación manteniendo la viabilidad espermática (factor de almacenamiento) (Carpio, S., 2015).

2.2.5. Fundamentos del Daño Criogénico Durante la Congelación y Descongelación

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen (Escudero, 2015). Los cambios de volumen son sólo uno de los tantos factores de stress espermático durante el proceso de criopreservación. Otros están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a los crioprotectores, la formación y disolución de hielo, así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular.

Previo a la congelación el esperma es sometido a un proceso de enfriamiento, con una disminución de la temperatura desde la temperatura corporal hasta 5°C, que es donde se puede presentar el choque de frío, esto implica daño de las membranas celulares y alteración de la función metabólica (Muiño Otero, 2008), probablemente causada por cambios en la disposición de los componentes de la membrana que afectan a la actividad de las proteínas, lo que provoca una alteración general de la permeabilidad de la membrana al agua y a los solutos. Este efecto se puede prevenir controlando la velocidad de enfriamiento y añadiendo compuestos protectores a los diluyentes del semen (Medeiros et al., 2002).

El mayor problema son los daños causados por las bajas temperaturas, relacionados con el cambio de fase del agua intracelular y extracelular, cuando la temperatura desciende por debajo del punto de congelación extracelular con la formación de micro cristales de hielo (Wolkers & Oldenhof, 2015).

A los -5°C, las células y el medio extracelular permanecen sobre enfriados, mientras que a temperaturas que oscilan entre los -5°C y los -15°C se forma el hielo en el medio circundante, sin embargo el contenido intracelular se mantiene descongelado y subenfriado (Gao & Critser,

2000). La letalidad se produce en un rango de temperaturas intermedias de -15°C a -60°C (Großfeld et al., 2008).

El agua va hacia el exterior de la célula porque el potencial químico del agua es atraído por el estado congelado (extracelular), y dependiendo de la velocidad de enfriamiento se puede dar mayor o menor formación de cristales de hielo en el interior de la célula (Ugarelli et al., 2017), lo mismo ocurre en la descongelación pero a la inversa (Muiño Otero, 2008).

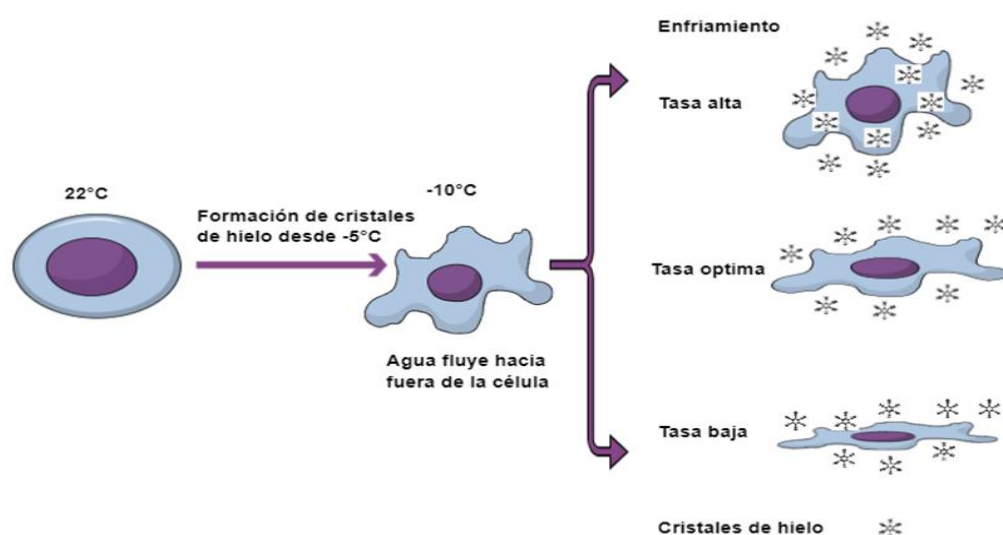


Figura 2 Tasas de enfriamiento y eventos físicos durante la congelación

Fuente. Yeste, (2016).

En la Figura 2. Cuando la temperatura desciende a -5°C , empieza la formación de hielo extracelular con la salida del agua de la célula, si las tasas de enfriamiento continuo son muy rápidas, el agua no fluye fuera de la célula en grandes cantidades y se forman cristales de hielo en el interior de la célula (Muldrew & McGann, 1994). Si las tasas de enfriamiento son lentas y prolongadas, el agua intracelular sale y las células se deshidratan demasiado, entonces las tasas de enfriamiento óptimas son aquellas que mantienen un equilibrio para evitar la formación de

hielo intracelular y minimizar las lesiones por la concentración de solutos y de volumen celular, el hielo extracelular resulta menos dañino que el intracelular (Yeste, 2016).

Cuando se deshidratan demasiado, el estrés hipertónico resultante puede cambiar el equilibrio electrolítico, y esto puede influir posteriormente en la descongelación, provocando que las células se hinchen más allá de su volumen isotónico normal y su posterior lisis (Gao & Critser, 2000).

Es posible predecir el efecto de la tasa de enfriamiento sobre la supervivencia celular, por lo que la tasa óptima debe buscar un equilibrio entre el riesgo de congelación intracelular y los efectos de los solutos concentrados (Pegg, 2015). No obstante, el hielo extracelular no siempre es seguro, por lo que es necesario no sólo asegurar la supervivencia celular sino también evitar daños de la estructura extracelular (Wolkers & Oldenhof, 2015). Cuando la tasa de congelación se encuentra dentro de los valores requeridos (50-100°C/min), se reduce la deshidratación intracelular y las concentraciones de solutos intracelulares, como también la contracción de las células (Shah et al., 2016).

Un enfriamiento más rápido no creará inconvenientes con un sistema adecuado de amortiguación del semen (CPA)(Gao & Critser, 2000). Se ha comprobado que la reducción de la temperatura del semen del toro desde la temperatura corporal hasta los 5°C a una velocidad de -10°C/h tiene efectos perjudiciales mínimos (Fuller & Paynter, 2004). En la actualidad para pajillas de 0,25 ml congeladas en vapores de nitrógeno líquido, la velocidad de descenso térmico normalmente es de -5°C/min desde los +5°C hasta los -10°C; de -40°C/min desde los -10°C hasta los -100°C; y de -20°C/min desde los -100°C hasta los -140°C. Esta curva de congelación rápida intenta minimizar los daños que implica la congelación (Wolkers & Oldenhof, 2015). Con una

adecuada criopreservación se pueden obtener altas tasas de viabilidad y movilidad espermática para una fertilización exitosa (Lyashenko, 2015).

En el semen, a pesar de que una gran proporción (40 – 60 %) de espermatozoides de carnero preservan su motilidad después de la congelación – descongelación, sólo un 20 – 30 % permanece fisiológicamente sin daño. Un espermatozoide puede presentar motilidad, aunque este dañado, siendo improbable que penetre el gameto femenino y que además lo fecunde.

2.2.6. Efectos causados por la Criopreservación

La formación de hielo intracelular origina ruptura de ciertas estructuras celulares además de desorganización de la membrana plasmática y acrosomal, con alteración en la fase lipídica y desplazamiento de las proteínas intrínsecas. La concentración de solutos produce la desnaturalización de los componentes de la membrana plasmática y deshidratación celular disminuyendo su volumen hasta un mínimo donde se compromete la integridad estructural de la célula (Watson & Duncan, 1988).

Otra alteración observada en los espermatozoides sobrevivientes a estos procesos es el aumento del calcio libre intracelular. También se ha demostrado que estos procesos inducen a un cierto grado de estrés oxidativo por parte del espermatozoide, provocando efectos tóxicos sobre ellos que a la larga comprometen su funcionalidad. Las mitocondrias también son vulnerables al daño criogénico y, en el peor de los casos, el núcleo puede verse afectado. Por lo tanto, podemos concluir que la formación de cristales de hielo y el efecto solución son los principales factores implicados en el daño celular por lo que el objetivo es tratar de reducirlos y contrarrestar sus efectos (Dalmazzo Henríquez, 2008; Yeste, 2016).

2.2.6.1. Efectos de la Criopreservación sobre la Movilidad. Las alteraciones de la movilidad debidas a la crioconservación se refieren a subpoblaciones de espermatozoides móviles, donde la movilidad muestra un alto grado de variabilidad biológica, considerada en algunos casos como un dato justo de la fertilidad (Khalil et al., 2018). Sin embargo, en bovinos y ovinos hay una amplia variación, (alrededor del 20%) en el porcentaje de movilidad posterior al deshielo que no se correlaciona con la fertilidad. Por lo tanto, es importante utilizar pruebas más eficientes para una mejor evaluación (Khalil et al., 2018).

En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajuela necesario para obtener la máxima fertilidad in vivo se ha establecido en 15 millones, con al menos el 50% de movilidad progresiva postdescongelación (Muiño, 2008).

2.2.6.2. Efectos de la Criopreservación sobre la Viabilidad. La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son: la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Valdez, 2013).

La membrana plasmática semipermeable, envuelve todo el espermatozoide y está compuesta por una amplia variedad de lípidos, proteínas y carbohidratos. Esta estructura es vital para la regulación de las funciones de los espermatozoides al establecer gradientes iónicos, facilitar la entrada citosólica de moléculas más grandes, además está involucrada en eventos de señalización celular (Varner & Johnson, 2007), y el intercambio iónico de sodio, potasio y calcio que regula la movilidad y las funciones mitocondriales, respectivamente (Wolkers & Oldenhof,

2015). La membrana plasmática posee receptores que median la unión y fusión de la zona espermiática, como PH-20 (Khalil et al., 2018), citocromo P450 y otros receptores que regulan la capacitación espermiática (Martínez-Soto et al., 2011).

Una prueba sencilla como la prueba de HOST permite evaluar la integridad de la membrana, donde la semipermeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de los espermatozoides vivos permiten el ingreso de agua cuando son expuestas a una solución hipoosmótica que provoca cambios morfológicos apreciables (Rubio-Guillén et al., 2009). Esta prueba seminal se fundamenta en que el medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio entre los medios intracelular y extracelular, situación que el espermatozoide trata de compensar difundiendo agua al compartimento intracelular; considerando un aumento del volumen celular (Sánchez y Zamora, 2016).

La membrana plasmática contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y tiene una capacidad antioxidante limitada, estos son sensibles a la peroxidación lipídica producto de reacciones químicas consecuentes de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Chatterjee & Gagnon, 2001; Bollwein & Bittner, 2018). Existen numerosas consecuencias o daños posdescogelación, que incluyen deterioro a la membrana, inhibición de la respiración y fuga de enzimas intracelulares (Großfeld et al., 2008). La capacidad antioxidante y la peroxidación lipídica se ven afectadas por el proceso de criopreservación, al igual que la movilidad espermiática reducida relacionada con la lenta recuperación antioxidante después de la congelación y descongelación (Kar et al., 2015).

El estrés térmico debido al cambio de temperatura, el estrés osmótico causado por la adición de altas concentraciones de agentes crioprotectores y por la cristalización, resulta en

desnaturalización de proteínas, contracción y colapso irreversible de la membrana, siendo esta la estructura más afectada (Khalil et al., 2018), así como reducción de la movilidad e integridad funcional espermática (Ahmed et al., 2019). Además, la criopreservación afecta la homeostasis del calcio, la integridad del acrosoma, con trastorno de lípidos de la membrana, también hay una interrupción de las interacciones de lípidos y proteínas, y algunas proteínas como los canales iónicos, se desplazan y pierden su función (Yeste, 2016). Esto provoca la pérdida de ATP, proteínas y enzimas esenciales, que conducen a la reducción de la movilidad de espermatozoides posdescongelación (Kumar et al., 2019). Además, según Watson (2000) alrededor del 40-50% de la población no sobrevive a la criopreservación incluso con protocolos optimizados.

Hallazgos recientes muestran que el daño en la membrana plasmática del espermatozoide bovino causado por la criopreservación está asociado con el aumento de calcio intracelular que conduce a una disminución de $\Delta\Psi_M$, ATP y producción de ERO (Treulen et al., 2018). Asimismo, el ataque peroxidativo a los ácidos grasos poliinsaturados causa daños estructurales y funcionales, es decir, la membrana pierde su propiedad semipermeable ya que es más frágil, lo que conduce a la lixiviación de la membrana, el flujo de colesterol, el influjo de calcio, la capacitación y los cambios acrosómicos similares a una reacción acrosomal que reduce la fertilidad de los espermatozoides y la viabilidad (Kumar et al., 2019).

Los enlaces dobles de la membrana plasmática hacen que se debilite la unión C-H en los átomos de carbono adyacentes y facilita la extracción de hidrógeno conduciendo al estrés oxidativo (Aitken & Fisher, 1994). Aunque la especie reactiva de oxígeno anión superóxido (O_2^-) es relativamente poco reactivo, en presencia de H^+ se dismuta o por enzimas se cataliza en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), establecido como el principal iniciador del daño peroxidativo en la membrana plasmática del espermatozoide (Gosalvez et al., 2017).

Sin embargo, el H_2O_2 y el O_2^- por sí solos no inician la cascada de peroxidación lipídica, pero estos pueden formar al radical hidroxilo (OH), quien reacciona ante la presencia de metales de transición como el hierro y cobre y desencadenan la peroxidación lipídica, propagándose así el daño en la membrana plasmática (Castro-Pozo, 2019).

2.2.6.3. Efectos de la Criopreservación sobre la Morfología Espermática. El estudio morfológico permite detectar anomalías de la cabeza, pieza intermedia y cola, defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de las cabezas, entre otros (Stornelli y de la Sota, 2017).

No se recomienda el uso del semen de toro con altos niveles de anomalías espermáticas para la inseminación artificial porque probablemente conduciría a la subfertilidad (Al-Makhzoomi, 2005). Existe una influencia negativa de los espermatozoides anormales y muertos en la población de espermatozoides restante (Lindemann et al., 1982).

Hay varios sistemas de clasificación. Las anomalías primarias son de origen testicular o, más específicamente, ocurren durante la espermatogénesis, mientras que las anomalías secundarias son de origen epididimario, estas difieren ligeramente de las categorías mayores / menores definidas por Blom (Hopper & King, 2014).

La mayor parte de los defectos morfológicos son primarios y se relacionan con la formación de la célula espermática en la hilera seminal. Algunos defectos de la cola (gota citoplasmática distal, colas dobladas) se originan en el tránsito espermático por el epidídimo durante la maduración espermática (Stornelli y De la Sota, 2017).

Otra clasificación es de anomalías compensables y no compensables. Las deficiencias seminales compensables incluyen una serie de rasgos conocidos de viabilidad y

morfología (incluidas cabezas y colas anormales) que impiden el acceso de los espermatozoides al óvulo y que no pueden explicarse mediante evaluaciones convencionales (Saacke, 2008). La idea de que otras características del esperma sean compensables, por ejemplo, la integridad de la membrana, el potencial de la membrana mitocondrial está en aumento (Kastelic, 2013).

Las deficiencias en la fertilidad del esperma, se considera no compensables, espermatozoides fecundantes morfológicamente normales o casi normales con cabezas deformes presentes en eyaculados anormales, incapaces de descondensar su ADN después de la fertilización (Saacke, 2008). Presentan daño de la cromatina del esperma, del estado de la protamina, entre otros (Kastelic, 2013). Los espermatozoides con estos defectos pueden alcanzar el óvulo e iniciar el proceso de fertilización, pero no pueden sostenerlo o dan como resultado una mala viabilidad embrionaria (Hopper & King, 2014).

Debido a que la fertilidad del toro está influenciada por una serie de factores, ninguna prueba de diagnóstico puede predecir con precisión la fertilidad, sin embargo, puede resultar más informativa una combinación adecuada de pruebas de laboratorio (Kastelic & Thundathil, 2008).

2.2.7. Descongelación

La descongelación es un proceso que induce lesiones en los espermatozoides producto de la re cristalización y la hidratación excesiva con cambios perjudiciales en la estructura y función de los espermatozoides (Kadirvel et al., 2009; Ugarelli et al., 2017). Esto produce daño a la membrana del esperma y al citoplasma (Andrabi, 2009; Benson et al., 2012), en el cual el mayor deterioro se da en la membrana plasmática con varios grados de hinchazón, ondulación o pérdida, además de estrés oxidativo, daño peroxidativo a la membrana plasmática de los espermatozoides y rotura de la cadena de ADN en el núcleo espermático (Kadirvel et al., 2009).

Todo esto genera deterioros en los espermatozoides que involucran el descenso de la movilidad, pérdida de fluidez de la membrana y reacción acrosómica anormal, lo cual termina por comprometer la fertilidad (Sivandzade et al, 2019), Además, la mayoría de los trabajos citados por Ahmed et al. (2019), concluyeron que si la velocidad de descongelación es rápida se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y mayor integridad acrosómica.

Con la descongelación rápida los cristales de hielo no tienen tiempo para formarse y los espermatozoides pasan directamente del estado congelado al estado líquido (El-Ahwany et al., 2018). De hecho, las bajas tasas de descongelación resultan en recristalización, proceso de crecimiento de cristales que es perjudicial para la célula (Ugarelli et al., 2017). El estrés osmótico se debe a las altas tasas de calentamiento, ya que los CPA no pueden salir de la célula lo suficientemente rápido. Tal aumento osmótico en el citoplasma hace que, entre el agua, y esto al final interrumpe la membrana plasmática (Borah et al., 2015).

Según Martínez-Soto et al. (2011) existe interacciones entre el método de congelación y la temperatura de descongelación para muestras de semen de alta calidad inicial, entre la congelación rápida en vapor de nitrógeno y la descongelación a 37°C, y la congelación controlada por computadora más lenta con una descongelación de 22°C al medio ambiente.

Hoy en día, la mayoría de los centros de inseminación artificial (IA) comerciales recomiendan métodos de descongelación con agua caliente, para semen bovino congelado en pajillas, donde se retira la pajilla del nitrógeno líquido y se coloca inmediatamente en agua a 33°C - 35°C durante 30 a 40 segundos (Doležalová et al., 2017). Así mismo, se recomienda descongelar el semen bovino criopreservado en pajillas, independientemente del tipo de

diluyente y la velocidad de enfriamiento, en un baño de agua a 33°C–35°C durante 30–40 segundos (DeJarnette & Marshall, 2005).

La dosis inseminante según la norma ISO 9002, debe tener un mínimo de 25% de espermatozoides con movilidad progresiva, o un mínimo de 8 millones de espermatozoides con movilidad progresiva, o 6 millones si el semen posee más de 30% de movilidad progresiva y si la tasa de anormalidades es inferior al 25% (Catena y Cabodevila, 1999).

Diversos estudios se han llevado a cabo para evaluar la influencia de las altas temperaturas de descongelación en la supervivencia y movilidad del espermatozoide, utilizando diferentes tasas de descongelación. Se ha demostrado que las temperaturas de descongelación tan altas como 60°C a 80°C, podría mejorar aún más la movilidad posdescongelación (Lyashenko, 2015).

Según Shah et al. (2016) el mejor protocolo de congelación y descongelación en su experimento fue: inclusión de 4 h de tiempo de equilibrio, velocidad de congelación rápida y la descongelación rápida a 70°C durante 7 segundos, en el protocolo de crioconservación programable, que mejoró la calidad posdescongelación de los espermatozoides de búfalo, en el que las altas tasas de descongelación indistintamente de los métodos, dan mejores tasas de movilidad y cinética espermática, en comparación de las temperaturas más bajas. Sin embargo, según los resultados del estudio de Doležalová et al. (2017), la descongelación rápida con altas temperaturas disminuyó la movilidad de los espermatozoides y las características del semen evaluado después de 2 horas de incubación, indicando que el método rápido de descongelación de pajillas no es el más adecuado para la inseminación artificial.

Resultados similares fueron descritos por Rastegarnia et al. (2013), quienes encontraron una mayor proporción de movilidad progresiva y características de movimiento de los espermatozoides, después de la descongelación utilizando protocolos con temperaturas más altas. Sin embargo, esta ventaja relativa había desaparecido después de 2 horas de incubación, en comparación con el método de descongelación lenta (30°C, 50 segundos) (Doležalová et al., 2017).

En un estudio con semen de Yak se encontró que a excepción de la movilidad después de la descongelación en agua a 35°C durante 60 segundos y a 37°C durante 30 segundos, la mejor calidad seminal fue la obtenida por la descongelación a 75°C durante 9 segundos, además la descongelación a 50°C obtuvo mejores resultados que a 70°C y a 35°C (Borah et al., 2015). Sin embargo, el uso de una temperatura tan alta está lejos de ser un método práctico para descongelar las pajillas, especialmente en condiciones de campo (Muiño et al., 2008).

En el experimento de Kombarova et al. (2018), los mejores resultados con espermatozoides bovinos se lograron descongelando pajillas durante 10 segundos en agua a 38°C.

No obstante, la descongelación se ha venido dando hasta la actualidad de una manera convencional mediante agua a una temperatura y tiempos preestablecidos, esto ocurre generalmente fuera del laboratorio en condiciones de campo que son muy difíciles de controlar y garantizar, ya que las largas distancias o la no disponibilidad de agua limpia dificulta hacer un correcto proceso de descongelación con agua. Otra desventaja de la descongelación con agua es que el tapón de algodón de la pajilla explote si no se mueve esta una o dos veces antes de ponerla en el baño de agua caliente (Solano y Ramón, 2013).

Se ha observado que el aire es un método de descongelación factible para distintas células y tejidos vitrificados (Wolkers & Oldenhof, 2015). La conducción de calor por medio de aire caliente proporciona una solución práctica y confiable que soporta los requisitos de Buenas Prácticas de Manufactura, sin la necesidad de utilizar agua que puede resultar en una fuente potencial de contaminación (Cook Regentec, 2016).

Sin embargo, no hay estudios realizados sobre descongelación de pajillas de bovino con aire caliente. Algunos estudios han utilizado el aire para la descongelación de pajillas en equinos y en humanos. En sementales se ha evaluado la descongelación con agua caliente, aire, agua fría, y baño de hielo, donde la descongelación con agua caliente dio los mejores resultados espermáticos (Mottershead, 2000).

En un estudio con semen de humanos se utilizó la descongelación con aire de pajillas, resultando en una mejor supervivencia espermática a 20°C o 35°C en aire que otros métodos de descongelación (Mahadevan & Trounson, 1984). Sin embargo, en otro estudio en el cual descongelaron pajillas a temperatura ambiente y luego en aire a 37°C, y en agua a 37°C, se observó un efecto positivo de la metodología de descongelación con agua en los parámetros espermáticos como movimiento lineal rápido, mayor viabilidad, menos daño en el acrosoma y menor peroxidación lipídica (Martínez-Soto et al., 2011).

Por ejemplo, Santos et al., (2018) midieron la transferencia de calor en sistema abierto y cerrado de cryotop, en el cual la descongelación con aire condujo bajas tasas de transferencia de calor por el espesor de la tapa de plástico y el fluido externo, con una alta posibilidad de formación de hielo debido a la desvitrificación o recristalización a comparación del agua, ya que

el agua como fluido de calentamiento por inmersión permite una mayor tasa de transferencia de calor.

En una investigación con ovocitos de ratón MII "vitrificados" informaron que la supervivencia está determinada principalmente por la tasa de calentamiento. La velocidad de enfriamiento tiene poco efecto, siempre que se calienten lo más rápido posible (alrededor de 3000°C por minuto) (Seki & Mazur, 2008). El calentamiento lento es perjudicial porque deja tiempo para que los pequeños cristales de hielo intracelulares formados durante el enfriamiento crezcan hasta un tamaño perjudicial durante el calentamiento (Seki & Masur, 2011).

2.3. Marco Legal

Constitución Política de Colombia de 1991. Artículo 65. La producción de alimentos gozará de la especial protección del Estado. Para tal efecto, se otorgará prioridad a las actividades agrícolas, pecuarias, pesqueras, forestales y agroindustriales.

Ley 29 de 1990 dicta disposiciones para el fomento de la investigación científica y el desarrollo tecnológico y dispone que le corresponda al Estado promover y orientar el adelanto científico.

Ley 740 de 2002. Por medio se aprueba el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Resolución 020033. Por medio de la cual se establecen los requisitos sanitarios y de bioseguridad para el registro de centrales de recolección e importadores de material genético.

Resolución 00 3650. Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro como productor de material genético.

3. Metodología

3.1. Tipo de Investigación

El presente estudio fue de tipo experimental cuantitativo, con el cual se evaluó la integridad funcional de los espermatozoides bovinos sometidos a dos métodos de descongelación con diferentes tasas de calentamiento.

3.2. Población y Muestra

El tamaño de la muestra fue de 150 pajillas, las cuales tuvieron una semana de almacenamiento, las mismas fueron procesadas bajo un protocolo estándar con el diluyente Triladyl® + yema de huevo, con una concentración final de 60×10^6 espermatozoides/ml, envasado en pajillas de 0.5 ml, con descenso gradual de temperatura durante cuatro horas, congelación convencional en vapores de nitrógeno líquido y almacenamiento final en un tanque de almacenamiento seminal.

3.3. Diseño Estadístico

Consistió de un diseño de tipo factorial, donde el factor A correspondió al método de descongelación, el factor B, hizo referencia a la temperatura a descongelar y el factor C al tiempo. Los tratamientos de descongelación se describen en la Tabla 1.

Tabla 1 Relación entre factores con las pajillas almacenadas para evaluar la calidad seminal

Factor A Modelo de descongelación	Factor B	Factor C	Muestras									
	Temperatura descongelación (°C)	Tiempo descongelación (Seg)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Agua	36	30										
	38	30										
	40	30										
Aire	36	26										
	38	27										
	40	28										

Nota: Esta tabla muestra el tipo de diseño a implementar, en donde se evaluaron un total de 50 muestras (25 muestras con descongelación mediante agua caliente y 25 muestras con aire caliente) por cada parámetro de calidad espermática (movilidad, viabilidad y morfología).

3.4. Hipótesis

La descongelación de semen bovino con un flujo de aire caliente permitirá obtener parámetros de calidad espermática similares o superiores a los obtenidos con la descongelación convencional en agua caliente.

3.5. Variables

3.5.1. Variable Independiente

La temperatura de calentamiento (36°C, 38°C y 40°C).

3.5.2. Variables Dependientes

- Vitalidad (vivos-muertos), se evaluaron en porcentaje.
- Motilidad, se evaluaron en porcentaje
- Morfología, se evaluaron en porcentaje

3.6. Fases de Investigación

3.6.1. Fase Pre-experimental

3.6.1.1. Modelo de Descongelación por Aire. Para la elaboración del dispositivo experimental se requirió de:

- Secador de pelo (3 niveles de T°C, siendo el primero aire frío y 3 aire caliente)



Figura 3 Secador de cabello FKF (110-120V)

- Tubo de PVC (1,5 in X 1m de largo)
- Termómetro digital (marca buzzle)



Figura 4 Termómetro digital Buzzle (32°C - $42,9^{\circ}\text{C}$)

- Cronómetro

3.6.1.2. Toma de Temperatura y Tiempo para la Descongelación. Para saber a qué tiempo se llegó a las temperaturas 36°C , 38°C y 40°C se procedió de la siguiente manera:

- a) Como podemos observar en la Ilustración 5, insertamos la boquilla del secador a un extremo del tubo de PVC y al otro la punta del termómetro digital a unos 12 cm aproximadamente.



Figura 5 Modelo para el descongelamiento de pajuelas

- b) Para la toma del tiempo y la temperatura se tuvieron en cuenta los tres tipos de velocidades del secador; la cual se planteó de la siguiente manera:
 - Se observó que luego de 25 segundos de encendido el secador con el nivel de temperatura 1 la temperatura se mantuvo en 32°C , es aquí donde se toma la iniciativa de luego de los 25 seg con el nivel 1 pasar al nivel 2 en la cual evidenciamos que aumentaba la temperatura a más de 40°C a mayor tiempo con este nivel, de este análisis se prosiguió a experimentar con los tiempos de este nivel; donde se obtuvo:

Tabla 2 Tiempo y Nivel empleados para lograr las temperaturas deseadas

Nivel de T° 1	Nivel de T° 2	Temperatura °C
25 seg	1 seg	36
25 seg	2 seg	38
25 seg	3 seg	40

Nota: Esta tabla muestra el tiempo requerido con cada nivel correspondiente para lograr las temperaturas deseadas de 36°C, 38°C y 40°C

3.6.2. Fase Experimental

3.6.2.1. Evaluación de la Movilidad y Cinemática de los Espermatozoides. Este análisis computarizado se realizó exclusivamente a las muestras de semen refrigerado. Además, para evaluar las muestras se utilizó el (Computer Assisted Motility Analysis, SCA®) CASA a través del (Sistema Integral de Análisis de Semen) ISAS® (Broekhuijse et al., 2011). Para tal fin, se colocó una alícuota de semen de 5µL, en la SpermTrack®, para luego ser llevada al microscopio de contraste de fases a 200X de aumento y analizada utilizando el software en el módulo de motilidad mencionado, conectado a un procesador Intel Core I5, la intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara será igual para todas las muestras (Ruiz et al., 2015).

3.6.2.2. Evaluación de la Vitalidad Espermática. La vitalidad espermática se valoró mediante la prueba de eosina-nigrosina modificada, en el semen fresco y congelado (Brito et al., 2011).

En la cual se adiciono en una lámina de portaobjetos una alícuota de 10 μL de semen y 10 μL del colorante eosina-nigrosina, el cual se homogenizo suavemente y se hizo frotis, dejando secar por 30 minutos. Las muestras se evaluaron en el microscopio con el objetivo de inmersión de 100X, cuantificando un total de 100 espermatozoides para la evaluación de la vitalidad espermática; En donde se tuvo presente que los espermatozoides con la integridad de la membrana dañada (muerto), se observara de color rosado oscuro, por el contrario, en los espermatozoides vivos, se evidenciara de color blanco (no teñidos) (Zhu & Liu, 2000; Tsakmakidis et al., 2010). Los resultados son expresados en porcentaje (%).

3.6.2.3. Evaluación de la Morfología Espermática. La integridad funcional de la membrana celular de los espermatozoides se justipreció mediante la prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST) (Přinosilová et al., 2014; Khalil et al., 2019).

Bajo la metodología de Quintero-Moreno et al., (2003): se manejó una solución con una osmolaridad de 154 mOsm/mL. Las muestras criopreservadas, se prepararon en viales de 2 mL por muestra seminal. Se vertió en cada uno de los viales, 100 μL de la solución HOST (154 mOsm) y 10 μL del semen y se mantiene por 30 min a baño María a 37°C, 38°C y 40°C. Al término del tiempo, se llevó 10 μL de la solución (semen + medio) y se realizaron los extendidos a los portaobjetos.

Una vez, listas las muestras (secas y fijadas) se tiñeron con la tinción Diff-Quick. Las muestras se evaluaron en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión de 100X. Se contaron un aproximado de 100 espermatozoides por muestra, observando la reacción de los

mismos, los cuales fueron clasificados según su apariencia en: normales y los que presentan morfoanomalías.

Las morfoanomalías a tener en cuenta para el análisis partieron las de tipo primarias: defectos de cabeza (tamaño y apariencia) y secundarias: solo cabeza y solo cola. El resultado final se expresó en porcentaje e indica la proporción de malformaciones, aceptándose no más del 25%. (Quispe, 2018).

3.6.2.4. Análisis Estadístico. Los datos se sometieron a un análisis de varianza, considerando un experimento factorial, donde el factor A es el método de descongelación y el factor B los tres niveles de temperatura: 36°C, 38°C y 40°C, las pajillas se tomaron como unidad experimental. Cuando $P < 0.05$, Tukey se compararon las medias. Según resultados, se tendrá en cuenta un análisis de medidas repetidas. Se utilizó el software InfoStat.

4. Resultados y Discusiones

4.1. Efecto sobre la Movilidad y Cinemática Espermática

En el presente estudio los resultados de calidad posdescongelación de toro fueron variables. Los resultados de los parámetros cinéticos y de movilidad espermática en la Tabla 3.

Tabla 3 Efecto del protocolo de descongelación sobre la movilidad y cinemática espermática

	Agua			Aire		
	36°C	38°C	40°C	36°C	38°C	40°C
MT	65,60 ± 1,24 (3,21%) ^b	70,24 ± 1,10 (5,2%) ^a	69,11 ± 1,24 (1,84%) ^{ab}	50,65 ± 1,32 (13,88%) ^d	56,14 ± 1,16 (4,83%) ^c	59,16 ± 1,32 (1,88%) ^c
MP	35,23 ± 1,12 (9,11%) ^a	35,2 ± 1,00 (8,75%) ^a	33,71 ± 1,12 (9,52%) ^a	20,81 ± 1,20 (17,02%) ^c	27,92 ± 1,06 (11,57%) ^b	31,77 ± 1,20 (7,68%) ^{ab}
VCL	40,41 ± 0,97 (2,72%) ^a	41,75 ± 0,87 (2,72%) ^a	39,79 ± 0,97 (3,34%) ^a	34,23 ± 1,04 (18,67%) ^b	37,92 ± 0,92 (5,72%) ^{ab}	40,53 ± 1,04 (2,66%) ^a
VSL	26,8 ± 3,55 (38,43%) ^a	21,95 ± 3,18 (55,76%) ^a	15,70 ± 3,55 (56,69%) ^a	17,9 ± 3,8 (60,73%) ^a	27,04 ± 3,35 (30,62%) ^a	25,76 ± 3,8 (33,19%) ^a
VAP	33,39 ± 2,53 (21,74%) ^a	30,24 ± 2,26 (26,32%) ^a	23,16 ± 2,53 (31,13%) ^a	23,76 ± 2,7 (40,28%) ^a	28,11 ± 2,38 (13,55%) ^a	31,80 ± 2,7 (19,25%) ^a
ALH	1,85 ± 0,23 (22,16%) ^a	2,07 ± 0,2 (22,71%) ^a	1,9 ± 0,23 (16,32%) ^a	1,9 ± 0,24 (32,11%) ^a	2,09 ± 0,21 (53,59%) ^a	1,79 ± 0,24 (27,37%) ^a
BCF	6,2 ± 1,04 (59,19%) ^a	6,05 ± 0,93 (26,61%) ^a	5,53 ± 1,04 (60,22%) ^a	5,87 ± 1,11 (53,32%) ^a	4,63 ± 0,98 (65,23%) ^a	4,87 ± 1,11 (54,21%) ^a

MT= movilidad total (%); MP= movilidad progresiva (%); VCL= velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$); VAP= velocidad media ($\mu\text{m}/\text{seg}$); VSL= velocidad lineal ($\mu\text{m}/\text{seg}$); ALH: desplazamiento lateral de la cabeza (μm). BCF: frecuencia de entrecruzamiento (Hz). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes en la misma fila denotan diferencia estadística significativas ($p \leq 0.05$).

Los tratamientos con agua estuvieron similares para los parámetros MP, VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, debido que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Con la metodología de aire se encontraron resultados superiores entre los tratamientos 38°C y 40°C

para el parámetro MT ($56,14 \pm 1,16\%$ y $59,16 \pm 1,32\%$); sin embargo, para los parámetros VSL, VAP, ALH y BCF no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos.

Para la investigación los indicadores MT, MP y BCF, se consideraron como indicadores de fertilidad (Hernández-Corredor et al., 2020), mientras que VCL se asoció con una baja fertilidad al ser un indicador de hiperactividad (Nongbua et al., 2018).

Los valores de MP del presente estudio a excepción de aire 36°C ($20,81 \pm 1,20\%$) y 38°C ($27,92 \pm 1,06\%$) están dentro de las recomendaciones de la norma ISO 9002, que establecen que la dosis inseminante debe tener un mínimo de 8 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Este número puede reducirse a 6 millones si el semen posee más de 30% de espermatozoides con motilidad progresiva y si la tasa de anomalías es inferior al 25% (Benavides Torres, 2008).

En los valores de la velocidad (VCL, VAP, VSL) son medidos en unidades de distancia $\mu\text{m}/\text{seg}$, donde el VSL es siempre el valor de velocidad más bajo para cualquier espermatozoide, y es muy similar al valor de VAP (Mortimer, 2000). En el ganado bovino, el aumento de VCL y ALH es indicativo de hiperactividad, que puede no ser deseable para inseminación, pero podría ser aceptable para FIV, la disminución de ALH y VCL, podrían ser beneficiosas en muestras de esperma para IA, mientras que la disminución de VAP podría ser perjudicial para la fertilidad (Hernández-Corredor et al., 2013). Se acepta universalmente como características distintivas de los espermatozoides hiperactivos valores de VCL superior a $70 \mu\text{m}/\text{s}$ y de ALH superior a $7 \mu\text{m}$ (Kathiravan et al., 2011). Sin embargo, en el presente estudio se observó un VCL y ALH bajo para todos los tratamientos.

Mottershead (2000) menciona que la descongelación de pajillas de sementales con agua caliente da mejores resultados que el aire; agua fría; y baño de hielo, al igual que en la investigación de Martínez-Soto et al. (2011) en el que obtuvieron un efecto positivo en los parámetros espermáticos con semen en humanos en la metodología de descongelación a 37°C en agua en comparación a la descongelación a temperatura ambiente y luego a 37°C en aire. Esto pudo deberse a la baja transferencia de calor en aire, ya que según el estudio de Santos et al. (2018), la descongelación con aire en el sistema abierto y cerrado de CRYOTOP®, debido al espesor de la tapa de plástico y el fluido externo condujo a bajas tasas de transferencia de calor a comparación del agua.

Sin embargo, en la investigación de Mahadevan & Trounson (1984) con espermatozoides humanos criopreservados, la descongelación lenta en aire a 20°C o 35°C en una superficie seca resultó en una mejor criosupervivencia de los espermatozoides en términos de porcentaje vivo y porcentaje de movilidad a cero y tres horas de incubación que los otros métodos de descongelación más lentos o más rápidos probados. Esto pudo deberse a que las bajas temperaturas de descongelación luego de ser incubadas podrían dar mejores parámetros en movilidad y cinética (Akmal et al., 2015), lo que podría indicar que a un mayor tiempo de descongelación con aire podría dar mejores resultados, sin embargo, esto aún no se ha probado.

4.2. Efecto en la Vitalidad Espermática

La prueba de eosina nigrosina permite ver detalles estructurales de los espermatozoides, además de poder observar la vitalidad de los mismos, ya que estos no son permeables al colorante cuando la membrana está intacta (Varner & Johnson, 2007).

En la presente investigación se logró una mejor vitalidad para la descongelación con aire, donde se encontraron resultados equivalentes entre tratamientos (con valores de $57,0 \pm 2,99\%$; $54,3 \pm 2,99\%$ y $61,2 \pm 2,11\%$; respectivamente); los cuales fueron superiores a los tratamientos de descongelación con agua ($P \leq 0,05$) (Figura 6).

Se observó que el método de descongelación con agua causó más daños sobre la integridad de la membrana de los espermatozoides, similar a lo descrito por Ahmed et al. (2019), con la ruptura irreversible de la membrana plasmática entre otras afecciones celulares. Estos daños pueden causar una disminución de la vitalidad y funcionamiento de los espermatozoides sobrevivientes al daño criogénico, daños que pueden ser subletales y / o letales (Varghese et al., 2016), como lo observado en la presente investigación.

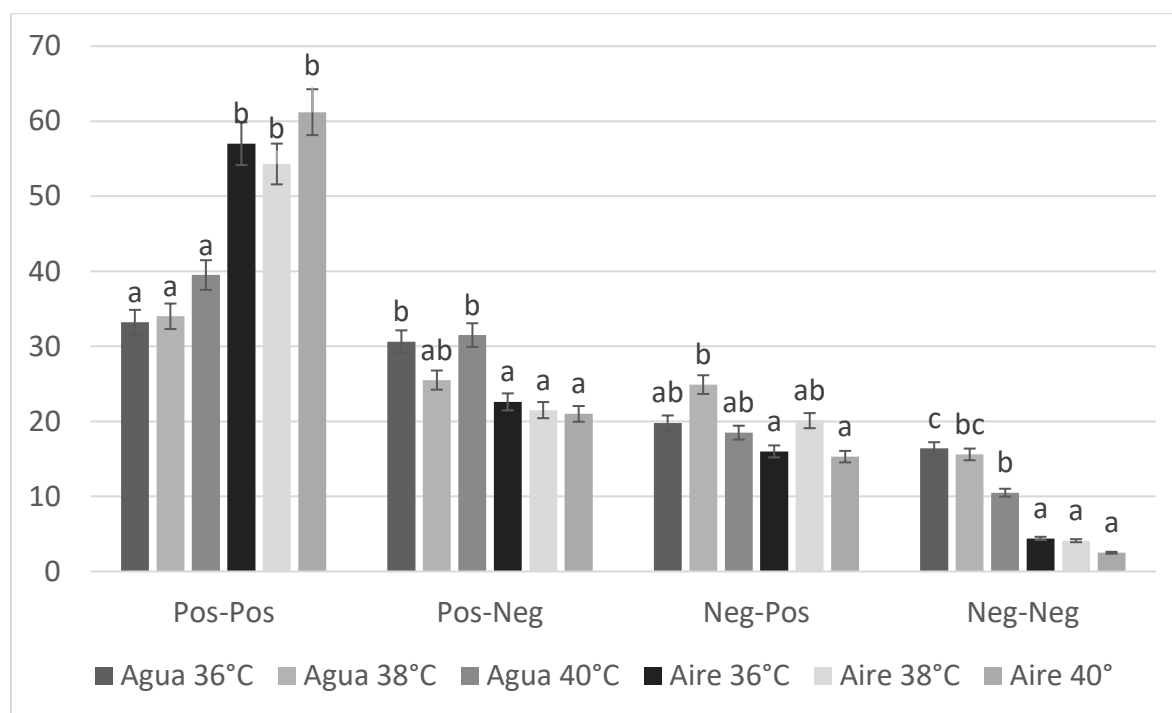


Figura 6 Efecto del protocolo de descongelación sobre la vitalidad espermática

Nota: Pos-Pos= Positivo-Positivo (%), Pos-Neg= Positivo-Negativo (%), Neg-Pos= Negativo-Positivo (%), Neg-Neg= Negativo-Negativo (%). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes denotan diferencia estadística significativas ($p \leq 0.05$).

4.3. Efecto en la Morfología Espermática

Los resultados de morfología espermática se presentan en la Figura 7.

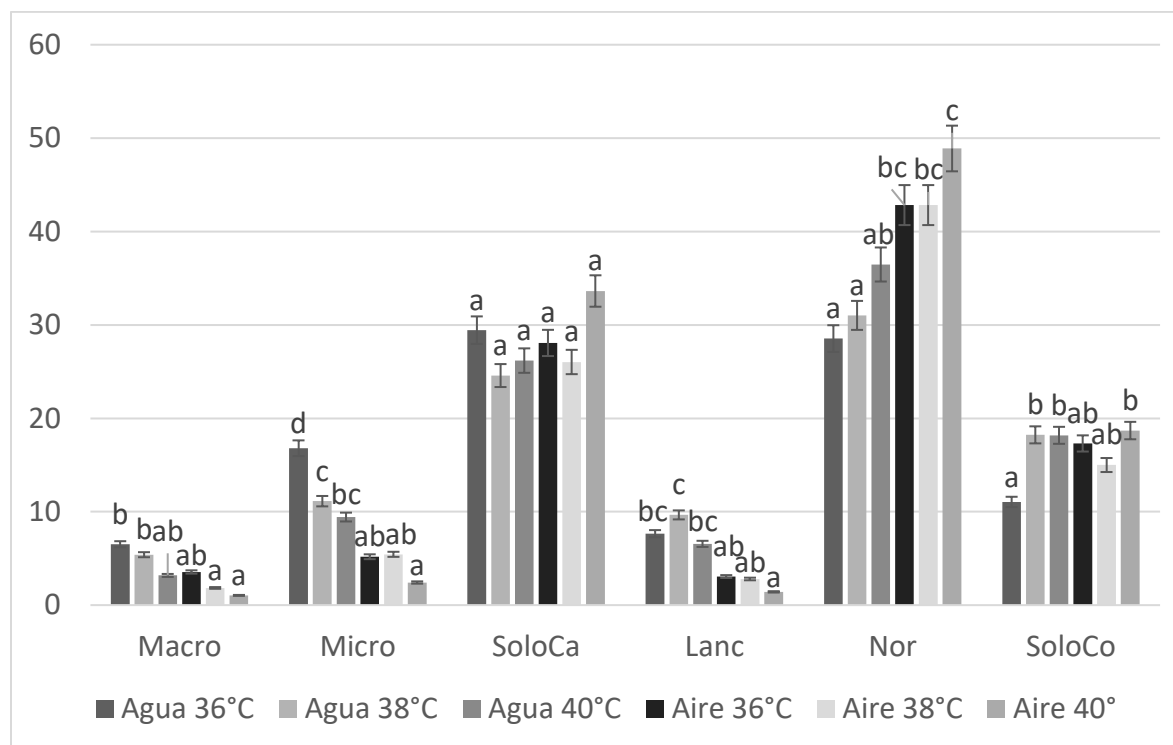


Figura 7 Efecto del protocolo de descongelación sobre la morfología espermática

Nota: Micro= Microcéfalo (%), Macro= Macrocéfalo (%), SoloCa= Solo Cabeza (%), Lanc= Lanceolados (%), Nor= Normales (%), SoloCo= Solo Cola (%). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes denotan diferencia estadística significativas ($p \leq 0.05$).

Se observa un resultado mayor para morfología normal con el método aire 40°C ($48,89 \pm 2,35\%$), el cual fue superior a aire 36° y aire 38° ($42,81 \pm 2,35\%$ y $42,83 \pm 2,33\%$), equivalentemente se evidencio una diferencia significativa con el tratamiento de descongelación con agua 36°C y 38°C ($28,54 \pm 3,33\%$ y $31,02 \pm 2,35\%$), respectivamente. Para la condición de solo cabeza, no existieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

En términos generales para las anomalías de macrocefalia, microcefalia y lanceolados se evidencio una derivación mayor con descongelación a agua 36°C ($6,52 \pm 0,98\%$,

16,8 ± 1,29% y 7,65 ± 1,44%) y 38°C (5,40 ± 0,69%, 11,13 ± 0,91% y 9,66 ± 1,02%) con relación a los tratamientos de descongelación con aire; siendo un efecto negativo para una calidad espermática deseable.

Estas alteraciones se producen por una espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas, por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (Hopper & King, 2014; Posado-Ferreras, 2014).

Para la presencia de solo cola no se presentan diferencias estadísticamente significativas con la descongelación por agua 38°C, agua 40°C y aire 40°C (18,23 ± 1,4%, 18,18 ± 1,4% y 18,69 ± 1,4%) respectivamente.

Se obtuvo una tasa de anormalidades primarias inferiores al 20% para agua 40°C, aire 36°C, aire 38°C y aire 40°C, similar a lo que recomienda Barth et al (2007), sin embargo, la tasa de anormalidades totales para aire 38°C y 40°C fueron inferiores a 39% la cual se determina que el semen es bueno, para agua 38°C, agua 40°C y aire 36°C se obtuvo una tasa de 40 - 59% situándose en un semen de calidad regular y para agua 36°C con una tasa >60% nos presenta un semen de mala calidad.

No se recomienda el uso del semen de toro con altos niveles de anormalidades espermáticas para la IA porque probablemente conduciría a la subfertilidad ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad (Mallma Marca, 2019).

En el estudio de Saacke et al. (1998) los espermatozoides con cabezas deformadas no acceden al óvulo.

5. Conclusiones

La descongelación con agua confiere mejores resultados en los parámetros de MT y MP que el resto de las temperaturas en aire, sin embargo, no se encontraron diferencias para los parámetros VCL, VSL, VAP, ALH y BCF con la descongelación con aire.

Los problemas relacionados en la vitalidad de los espermatozoides en cuanto a la integridad estructural de la membrana plasmática de los espermatozoides, son relacionados en parte con el manejo de la temperatura, tiempo y el método de calentamiento de las pajillas de semen bovino criopreservado. En este trabajo de investigación se evidencia un alto porcentaje de espermatozoides vivos mediante el método de descongelación propuesto con flujo de aire caliente.

Solo se evidencian 2 anormalidades espermáticas de la presencia de solo cola y solo cabeza que corresponden a anormalidades secundarias, en donde indicarían que el daño se ha producido del epidídimo o por manejo inadecuado a nivel de laboratorio, sin embargo, estas anormalidades poseen una recuperación mejor que las primarias.

El método de descongelación con aire en altas tasas de calentamiento muestra ser una alternativa, viable y eficiente que provee ventajas sobre la protección de la integridad estructural y funcional de los espermatozoides bovinos, en comparación con la descongelación convencional con agua.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa planteada de que la descongelación de semen bovino con un flujo de aire caliente permite obtener parámetros de calidad espermática similares o superiores a los obtenidos con la descongelación convencional en agua caliente.

6. Recomendaciones

Se propone evaluar en futuras investigaciones el aumento de los tiempos a (29" y 30") para aumentar las temperaturas evaluadas en la descongelación con aire a (42° y 44°) para obtener mejor referencia de datos en los resultados, ya que como pudimos observar en esta investigación que al manejar más temperatura se obtenía mayor calidad espermática; y con esto hacer una mejor comparación entre los dos métodos de descongelación para poder optimizar el nuevo protocolo de descongelación.

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación se sugiere crear un dispositivo electrónico que estandarice los tiempos (26", 27" y 28") y las temperaturas evaluadas (36°, 38° y 40°) en la descongelación con aire para no sobrepasar los rangos de tiempos y temperaturas, y con esto evitar muerte de espermatozoides por sobrepasarse al momento de la descongelación.

Se sugiere evaluar en futuros estudios la influencia del método de aire con diferentes tasas de calentamiento sobre la capacitación espermática, la capacidad fertilizante in vitro e in vivo.

7. Bibliografía

- Agredo Palechor, J. A. (2015). *Evaluación en fresco y post-descongelación de los Parámetros de Calidad Seminal en la Especie Ovina (Ovis aries) en el municipio de Bello (Antioquia)*, [Tesis de Pregrado, Universidad del Cauca]. Repositorio Institucional- Universidad del Cauca. <http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/xmlui/handle/123456789/881>
- Ahmed, H., Andrabi, S. M., Shah, S. A. H., & Jahan, s. (2019). Effect of Cryopreservation on CASA Characteristics, Mitochondrial Transmembrane Potential, Plasma and Acrosome Integrities, Morphology and In Vivo Fertility of Buffalo Bull Spermatozoa. *Cryo Letters*, 40(3), 173-180. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31095666/>
- Aitken, J., & Fisher, H. (1994). Reactive Oxygen Species Generation and Human Spermatozoa: The Balance of Benefit and Risk. *BioEssays*, 16(4), 259–267. <https://doi.org/10.1002/bies.950160409>
- Akmal, I., Anwar, M., Mehmood, A., Hassan, S. M., & Lal, C. (2015). Thawing/Holding Sahiwal Semen Straws in Ice Water for Artificial Insemination in Cattle - An Adaptive Experience. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(3), 867-869. https://www.researchgate.net/publication/283093215_thawingholding_sahiwal_semen_straws_in_ice_water_for_artificial_insemination_in_cattle_-_an_adaptive_experience
- Al-Makhzoomi, A. (2005). *Sperm Morphology in Progeny-Tested Swedish AI Dairy Bull Sires* [Master's Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU)]. https://stud.epsilon.slu.se/3613/2/al-makhzoomi_a_111118.pdf

- Alm, K., Peltoniemi, O. A., Koskinen, E. & Andersson, M. (2006). Porcine Field Fertility With Two Different Insemination Doses and the Effect of Sperm Morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 210-213.
https://www.academia.edu/45472903/Porcine_Field_Fertility_with_Two_Different_Insemination_Doses_and_the_Effect_of_Sperm_Morphology
- Andrabi, S. (2009). Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 552–569.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01240.x>
- Barth, A., Bó, G., Bogliatti, G., Tríbulo, H., & Tríbulo, R. (2007). *Fisiología de la Reproducción del Toro y Evaluación de la Capacidad Reproductiva*. IRAC.
- Bathgate, R. (2011). Antioxidant Mechanisms and their Benefit on Post-thaw Boar Sperm Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 23–25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01826.x>
- Benavides Torres, R. D. (2008). *Evaluación de tres Protocolos de Capacitación Espermática Bovina In Vitro a través de la Penetración Oocitaria* [Tesis de Pregrado, Universidad de La Salle]. Repositorio Institucional-Universidad de La Salle.
https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/143/
- Benson, J., Woods, E., Walter, E. & Critser, J. (2012). The Cryobiology of Spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>

- Biniová, Z., Stádník, L., Doležalová, M. & Ducháček, J. (2018). Effect of thawing method on bull sperm survival in ejaculates frozen in 4 ml and 8 ml volumes. *Czech Journal of Animal Science*, 63(10), 399–407. <https://doi.org/10.17221/117/2018-cjas>
- Bollwein, H. & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent *in vitro* embryo development. *Animal Reproduction*, 15(1), 703-710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2018-0041>
- Borah, B. K., Deka, B. C., Biswas, R. K., Chakravarty, P., Deori, S., Sinha, S. & Ahmed, K. (2015). Effect of thawing methods on frozen semen quality of yak (*Poephagus grunniens* L.) bulls. *Veterinary World*, 8(7), 831–834. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.8/July-2015/3.pdf>
- Brito, L., Greene M, L., Kelleman, A., Knobbe, M. & Turner, R. (2011). Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, 76(4), 745–750. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.007>
- Broekhuijse, M. L., Šoštarić, E., Feitsma, H. & Gadella, B. M. (March 2012). Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science*, 90(3), 779–789. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311>
- Carpio, S. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada* [Tesis de Pregrado, Universidad Politécnica Salesiana-Sede Cuenca]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7955/1/UPS-CT004815.pdf>

- Carrillo-González, D. y Hernández, D. (2016). Caracterización seminal de individuos ovinos criollos colombianos de pelo en el departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 8(2), 197-203. <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n2.2016.187>
- Castro-Pozo, G. V. (2019). Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides refrigerados con y sin dilutor [Tesis de Pregrado, Universidad Científica del Sur]. Repositorio Institucional-Universidad Científica del Sur. <https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/720>
- Catena, M. y Cabodevila, J. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1(3), 18-31. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evaluacion_de_semen_bovino_congelado.pdf
- Chatterjee, S. & Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), 451–458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- Comizzoli, P. & Wildt, D. E. (2013). Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 91-98. <https://doi.org/10.1071/rd13259>
- Constitución Política de Colombia [Const]. Art. 65. 7 de julio de 1991 (Colombia). <https://pdba.georgetown.edu/Constitutions/Colombia/colombia91.pdf>

- Cook regentec. (December 22, 2016). *Cook regentec and asymptote introduce the cellseal® automated thawing system*. <https://www.labbulletin.com/articles/cook-regentec-asymptote-introduce-cellseal-automated-thawing-system>
- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarraga, M. M. y Fernández, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino* (2da edición). INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf
- Dalmazzo Henríquez, P. (2008). *Comparación de dos métodos de congelación de semen ovino* [Tesis de Pregrado, Universidad Austral de Chile]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fvd148c/doc/fvd148c.pdf>
- DeJarnette, J. M. & Marshall, C. E. (2005). Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3868-3875. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)73072-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)73072-1)
- Díaz-Duque, N. y López-Castaño, P. (2018). *Protocolos de criopreservación de semen bovino*. [Tesis de Pregrado, Universidad Tecnológica de Pereira]. Repositorio Institucional-Universidad Tecnológica de Pereira. <https://repositorio.utp.edu.co/items/b5033abd-1751-4727-9754-efeadf91db6d>
- Doležalová, M., Ptáček, M., Stádník, L. & Ducháček, J. (2017). Effect of different thawing methods on bull's semen characteristics. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(3), 815-822. <https://doi.org/10.11118/actaun201765030815>
- Escudero Pozo, J. L. (2015). *Presentación de semen ovino mediante verificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales* [Tesis de Pregrado,

- Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Institucional-Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/5256>
- Espinosa Vargas, W. D. (2012). *Efecto de la adición de un surfactante natural (Aloe vera) al diluyente triladyl® para crioconservación de semen bovino en toros reproductores de AGSO-GENES, Quito-Pichincha* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Institucional-Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/690>
- El-Ahwany, A., Samir, H. & Alahwany, H. (2018). Using two different thawing temperatures and their effect on the motility recovery of human cryopreserved sperms in cancer patients. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(4), 331-334. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2018.04.007>
- Ferreira, G., Costa, C., Bassaiztegui, V., Santos, M., Cardozo, R., Montes, J., Settineri, R. & Nicolson, G. L. (2018). Incubation of human sperm with micelles made from glycerophospholipid mixtures increases sperm motility and resistance to oxidative stress. *Plos One*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197897>
- Fuller, B., & Paynter, S. (2004). Fundamentals of Cryobiology in Reproductive Medicine. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(6), 680–691. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61780-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61780-4)
- Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, 41(4), 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>

- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). The impact of sperm metabolism during *in vitro* storage: The stallion as a model. *Biomed Research International*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/9380609>
- Gosalvez, J., Tvrda, E. & Agarwal, A. (2017). Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34, 697–707. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0912-8>
- Großfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W., & Rath, D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 70(8), 1225–1233.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.017>
- Hernández-Corredor, L., Nivia-Osuna, A., Hernández-Villamizar, D., Rubio-Parada, J. A. y Quintero-Moreno, A. (2013). Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. *Respuestas*, 18(2), 16–27. <https://doi.org/10.22463/0122820x.443>
- Hernández-Corredor, L., Baez, G., & Bustamante-Cano, J. (2020). Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. *Journal of Dairy Veterinary & Animal Research*, 9(1), 34-38.
https://www.researchgate.net/publication/339213726_Effect_of_the_incorporation_of_plasma_rich_of_platelets_on_the_spermatozoa_physiology_of_ram_semen
- Hopper, R. M., & King, E. H. (2014). Evaluation of breeding soundness: basic examination of the semen, *Bovine Reproduction*, 68–78. <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch8>

- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (5 de noviembre del 2021). *Censo pecuario año 2021*. <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018.aspx>
- Kadirvel, G., Kumar, S., & Kumaresan, A. (August 2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*, *114*(1–3), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.10.002>
- Kar, S., Divyashree, B. C., & Roy, S. (1 March 2015). Temporal leakage of Cu, Zn superoxide dismutase and loss of two low-molecular-weight forms of glutathione peroxidase-1 from buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm after freezing and thawing. *Theriogenology*, *83*(4), 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.014>
- Kastelic, J. P. (1 October 2013). Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers*, *3*(4), 20–25. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0029>
- Kastelic, J., & Thundathil, J. (2008). Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*(2), 368–373. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01186.x>
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(1), 165–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>

- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan A. E., & Hassan, M. A. (1 March 2019). Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*, 126, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.017>
- Kombarova, N. A., Eskin, G. V, Abilov, A. I., Kornienko-Zhilyaev, Y. A., Vinogradov, V. N., & Galankina, A. A. (2018). Optimal mode to thaw cryopreserved sperm of holstein bull sires. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 53(6), 1219-1229. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1219eng>
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (11 December 2019). Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), 603–612. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- Fischman, M. L., Campi, S., González, L., Blasic, C., Ghirardi, M. P., Veksler, J. y Cisale, H. (2007). Valoración de la calidad seminal en semen ovino congelado de entre 9 y 15 años de antigüedad [Congreso]. *V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Canélidos Sudamericanos*, Mendoza, Argentina. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/10-fischman_semen.pdf

- Ley 29 de 1990. (27 de febrero de 1990). Congreso de la República de Colombia. Diario oficial No. 39.205. https://www.mineducacion.gov.co/1621/articles-184681_archivo_pdf_ley29.pdf
- Ley 740 de 2002. (24 de mayo de 2002). Congreso de la Republica de Colombia. https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Ley%200740%20DE%202002.pdf
- Lindemann, C. B., Fisher, M., & Lipton, M. (1982). A comparative study of the effects of freezing and frozen storage on intact and demembrated bull spermatozoa. *Cryobiology*, 19(1), 20–28. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(82\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(82)90121-3)
- Lossada, M. A. (2013). *Evaluación de dos diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino bajo condiciones de refrigeración* [Tesis de Maestría, Universidad del Zulia]. Archivo digital. <https://docplayer.es/88987232-evaluacion-de-dos-diluyentes-alternativos-para-la-preservacion-de-semen-porcino-bajo-condiciones-de-refrigeracion.html>
- Lyashenko, A. (2015). Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/s2305-0500\(14\)60051-8](https://doi.org/10.1016/s2305-0500(14)60051-8)
- Mahadevan, M., & Trounson, A. O. (1984). Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. *Andrología*, 16(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1984.tb00234.x>
- Mahecha, L., Gallego, L. A., y Peláez, F.J. (2002). Situación actual de la ganadería de carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. *Revista*

- Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15(2); 213-225.
<https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/323816/20781002>
- Mallma Marca, M. (2019). *Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein* [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac].
http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/798/T_0494.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Martínez-Soto, J. C., García-Vázquez, F. A., Gumbao, D., Landeras, J., & Gadea, J. (2011). Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology*, 63(3), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.08.001>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: ¿why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11775978/>
- Montoya-Páez, J. D., Giraldo-León, M., y Duque-Cortes, J. E. (2020). Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2).
<https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17818>
- Mortimer, S. T. (2000). CASA—practical aspects. *Journal of Andrology*, 21(4), 515–524.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
- Mottershead, J. (2000). *Thawing Frozen Semen and Preparing it for Artificial Insemination*.
<http://www.equine-reproduction.com/articles/thawing.htm>

- Muiño Otero, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas* [Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela]. Repositorio institucional-Universidad de Santiago de Compostela. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/2406>
- Muiño, R., Rivera, M. M., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E., & Peña, A. I. (2008). Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science*, *109*(1–4), 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.028>
- Muldrew, K., & McGann, L. E. (1994). The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal*, *66*(2), 532–541. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(94\)80806-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(94)80806-9)
- Nongbua, T., Al-Essawe, E. M., Edman, A., Johannisson, A., & Morrell, J. M. (2018). Adding bovine seminal plasma prior to freezing improves post-thaw bull sperm kinematics but decreases mitochondrial activity. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *64*(3), 183–190. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1455245>
- Olszewska-Slonina, D. (2013). Sperm cryopreservation and oxidative damage. What does it mean? *Central European Journal of Urology*, *66*(1), 50–51. <https://doi.org/10.5173/cej.2013.01.art15>
- Oresti, G. M., Peñalva, D. A., Luquez, J. M., Antollini, S. S., & Aveldaño, M. I. (1 December 2015). Lipid biochemical and biophysical changes in rat spermatozoa during isolation and functional activation in vitro. *Biology of Reproduction*, *93*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131201>

- Páez-Barón, E. M, y Corredor-Camargo, E. S. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 49-59. <https://doi.org/10.19053/01228420.3837>
- Pegg, D. E. (2015). Principles of Cryopreservation. In Wolkers, W., & Oldenhof, H. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Springer, New York, NY.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1
- Posado Ferreras, R. (2014). *Estudio de la calidad seminal del toro de lidia fragmentación del ADN espermático* [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid].
Repositorio Institucional-Universidad Complutense de Madrid.
<https://eprints.ucm.es/id/eprint/28594/>
- Přinosilová, P., Kopecká, V., Hlavicová, J., & Kunetková, M. (2014). Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Veterinaria Brno*, 83(4), 313–319. <https://doi.org/10.2754/avb201483040313>
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59(9), 1973-1990. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01297-9)
- Quispe, N. (2018). *Evaluación comparativa de la calidad seminal y funcional de semen crio preservado comercial de origen nacional en bovinos lecheros de tres centros de colección seminal, Arequipa, 2016* [Tesis de Pregrado, Universidad Católica de Santa María]. Artículo digital. <https://1library.co/document/y96nwjvy-evaluacion-comparativa-funcional-preservado-comercial-nacional-coleccion-arequipa.html>

- Ramónez, J., Landívar, S., Pesántez, J., y Rodríguez, D. (2017). Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación. *MASKANA*, 109-111.
<https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1501/1186>
- Rastegarnia, A., Shahverdi, A., Rezaei Topraggaleh, T., Ebrahimi, B., & Shafipour, V. (2013). Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal*, 14(4), 306–313. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23577311/>
- Resolución 003650. (13 de noviembre del 2014). ICA.
<https://www.ica.gov.co/getattachment/Areas/Pecuaria/Servicios/Bioseguridad-y-Recursos-Geneticos/3650-DEF.pdf.aspx>
- Resolución 020033. (05 mayo del 2016). ICA. <https://www.ica.gov.co/getattachment/af910d50-9adb-485e-a967-5ffe5a54e1d3/2016R20033.aspx>
- Rodríguez, E. G. (2020). *Evaluación de dos diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino refrigerado en el trópico bajo colombiano* [Tesis de Pregrado, Universidad Francisco de Paula Santander].
<https://repositorio.ufps.edu.co/bitstream/handle/ufps/4371/1630448.pdf?sequence=1>
- Rosenwaks, Z., Wassarman, P. M., & Gosden, R. G. (Eds.). (2014). *Human fertility: Methods and protocols* (1st ed.). Humana Press.
- Rubio-Guillén, J. L., Quintero-Moreno, A. A., y González-Villalobos, D. M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de

- espermatozoides de toros. *Revista científica*, 19(4), 382-389.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0798-22592009000400010
- Ruiz, G. L., Sandoval, M. R., y Santiani A. A. (2015). Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 49-56.
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10942>
- Saacke, R. (2008). Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70(3), 473–478.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.012>
- Saacke, R. G., Dejarnette, J. M., Bame, J. H., Karabinus, D. S., & Whitman, S. S. (1998). ¿Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology*, 50(1), 117–128.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691x\(98\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691x(98)00119-8)
- Sánchez, A. y Zamora, P. (2016). Efecto del medio hipoosmótico sobre la vitalidad espermática en semen canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2), 288–293.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v27n2/a10v27n2.pdf>
- Santos, M., Sansinena, M., Chirife, J., & Zaritzky, N. (2018). Convective heat transfer coefficients of open and closed Cryotop® systems under different warming conditions. *Cryobiology*, 84, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.007>

- Sathe, S., & Shipley, C. F. (2014). Cryopreservation of semen. En Hopper, R. (Ed.). *Bovine Reproduction* (pp. 662-670). Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch71>
- Seki, S., & Mazur, P. (2008). Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biology of Reproduction*, 79(4), 727–737.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069401>
- Seki, S., & Mazur, P. (2011). Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610° to $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, 62(1), 1–7.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.10.159>
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., & Qureshi, I. Z. (2016). Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*, 4(5), 972–976. <https://doi.org/10.1111/andr.12214>
- Singh, A., Kumar, A., Honparkhe, M., Kaur, S., Kaur, H., Ghuman, S., & Brar, P. (2018). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 195–202. <https://doi.org/10.1111/rda.13092>
- Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio-protocol*, 9(1).
<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3128>

- Solano, M., y Ramón, X. (2013). *Aplicación de P4 intravaginal en protocolos de IATF en vacas y aprovisionamiento de un equipo de inseminación artificial en el centro de apoyo "Juan Lunardi"* [Tesis de Pregrado, Universidad Politecnica Salesiana].
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5107/1/UPS-CT002700.pdf>
- Stornelli, M., y De la Sota, R. (2017). *Atlas de reproducción de animales de producción y compañía*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/62450>
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., & Aparicio, I. M. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 65–75.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x>
- Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Juliis, G. N., Zieschang, J.A., & Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061–2070.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>
- Treulen, F., Arias, M. E., Aguila, L., Uribe, P. & Felmer, R. (2018). Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. *Cryobiology*. 83, 65-74.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.001>
- Tsakmakidis, I. A., Lymberopoulos, A. G. & Khalifa, T. A. (2010). Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *Journal of Veterinary Science*, 11(2).
https://www.researchgate.net/publication/233916863_relationship_between_sperm_quality_traits_and_field-fertility_of_porcine_semen

- Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., y Santiani, A. (2017). Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 130–140.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n1/a14v28n1.pdf>
- Valdez, D. (2013). *Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado* [Tesis de maestría, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>
- Varghese, T., Divyashree, B. C., Roy, S. C., & Roy, K. S. (2016). Loss of heat shock protein 70 from apical region of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm head after freezing and thawing. *Theriogenology*, 85(5), 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.029>
- Varner, D. D., & Johnson, L. (2007). From a sperm's eye view-revisiting our perception of this intriguing cell. *Milne Lecture*, 53, 104-177.
<https://www.researchgate.net/publication/281307138>
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. & Onclin K. (2002). Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57(1), 149-179.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00664-1)
- Villa-Duque, N., Valencia-Giraldo, J. A., Gómez-Londoño, G. y Henao-Uribe, F. J. (2016). Efecto de los errores en la inseminación con semen congelado sobre la morfofisiología espermática bovina. Universidad de los Llanos. *ORINOQUIA*, 19(2), 46-55.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v20n1/v20n1a05.pdf>

- 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\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)
- Wolkers, W. F. & Oldenhof, H. (Eds.). (2015). *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (3rd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5>
- 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>
- Zhu, W. & Liu, X. (2000). Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian Journal of Andrology*, 2(2), 135-138. https://www.researchgate.net/publication/12098662_Cryodamage_to_plasma_membrane_integrity_in_head_and_tail_regions_of_human_sperm