



La criopreservación del germoplasma de especies ganaderas: Un paso hacia la sostenibilidad*

The cryopreservation of the germplasm of livestock species: A step towards sustainability

Ignacio Araya-Zúñiga^{1,3}, Francisco Sevilla^{2,3}, José A. González⁴, Kenneth Matamoros³, Anthony Valverde³

- * Recepción: 14 de agosto, 2024. Aceptación: 14 de octubre, 2024. Este trabajo formó parte del proyecto de investigación VIE-2151-083 "Optimización de la conservación y búsqueda de parámetros de la fertilidad en espermatozoides de animales de interés productivo" inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Este trabajo, además, formó parte de la tesis de Maestría del primer autor, Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica.
- ¹ Instituto Tecnológico de Costa Rica, Área Académica del DOCINADE, Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, igaraya@estudiantec.cr (<https://orcid.org/0000-0002-4292-2287>).
- ² Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Doctorado en Ciencias Naturales de para el Desarrollo (DOCINADE), Alajuela, Costa Rica. f.sevilla@tec.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-1480-4141>).
- ³ Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Alajuela, Costa Rica. kenneth.matamoros@estudiantec.cr (<https://orcid.org/0000-0002-0827-9726>); anvalverde@tec.ac.cr (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>).
- ⁴ Maestría en Gerencia Agroempresarial, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. jose.gonzalezmiranda@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0001-6857-5837>).

Resumen

Introducción. El cambio climático ha conllevado a la necesidad de modificar la forma de producción en los sistemas ganaderos. **Objetivo.** Revisar el estado del arte sobre la criopreservación de espermatozoides de especies ganaderas y sus posibles repercusiones sobre el desarrollo sostenible. **Desarrollo.** Se revisaron artículos científicos entre el 2000 y el 2024 de Web of Science, Scopus y Science Direct. La congelación espermática se puede considerar como una forma de optimizar la reproducción de los animales, sin embargo, durante el proceso se puede estimular la formación de especies oxígeno reactivas (ROS), que promueven la peroxidación lipídica de la membrana, lo que puede generar daños a nivel estructural y molecular que comprometen la funcionalidad espermática y la capacidad fecundante del gameto masculino. El éxito de la criopreservación de los espermatozoides de especies ganaderas puede ser mejorado mediante la inclusión de factores extrínsecos como la adición de antioxidantes, la centrifugación o la selección del tipo de congelación. Esta biotecnología reproductiva asociado con la inseminación artificial (IA) y la combinación de estas técnicas, ha permitido optimizar la rentabilidad de los sistemas ganaderos a través de la mejora genética continua. **Conclusiones.** La optimización de la criopreservación del germoplasma de las especies de interés zootécnico ha permitido el aumento de la productividad y la eficiencia de los sistemas ganaderos, así como la posibilidad de conservación de las especies, los cuales son factores claves para alcanzar la sostenibilidad.

Palabras clave: antioxidantes, centrifugación, diluyentes, especies oxígeno reactivas, conservación de biodiversidad.



Abstract

Introduction. Climate change has led to the need to modify the way of production in livestock systems. **Objective.** Review the state of the art on the cryopreservation of sperm from livestock species and its possible repercussions on sustainable development. **Development.** Scientific articles from 2000 to 2024 were reviewed from Web of Science, Scopus and ScienceDirect. Sperm freezing can be considered as a way to optimize the reproduction of animals, however, during the process the formation of reactive oxygen species (ROS) can be stimulated, which promote lipid peroxidation of the membrane, which can cause damage. at a structural and molecular level that compromise the sperm functionality and the fertilizing capacity of the male gamete. The success of cryopreservation of sperm from livestock species can be improved by including extrinsic factors such as the addition of antioxidants, centrifugation or selection of the type of freezing. This reproductive biotechnology is associated with artificial insemination (AI) and the combination of these techniques has made it possible to optimize the profitability of livestock systems through continuous genetic improvement. **Conclusions.** The optimization of cryopreservation of the germplasm of species of zootechnical interest has allowed for an increase in the productivity and efficiency of livestock systems, as well as the possibility of species conservation, which are key factors to achieve sustainability.

Keywords: Antioxidants, centrifugation, extender, reactive oxygen species, biodiversity conservation.

Introducción

La demanda creciente en la producción de alimentos junto con la presión constante que produce el cambio climático sobre los sistemas productivos deja en evidencia la necesidad de transformar la forma de producir (Vanvanhossou et al., 2021). La eficiencia reproductiva se considera un factor importante para conseguir una mayor eficiencia en los sistemas de producción ganaderos (Sakatani, 2022). La mejora reproductiva contribuye a mitigar el impacto de factores externos asociados al clima sobre los individuos, a la vez esto permite que el sistema productivo sea más resiliente y sostenible en el tiempo (Madhusoodan et al., 2019; Silpa et al., 2021).

La criopreservación de espermatozoides de especies ganaderas ha sido un elemento clave para preservar la fertilidad de los individuos dentro de los sistemas productivos (Hungerford et al., 2023), y la aplicación en conjunto con otras biotecnologías reproductivas, por ejemplo, la inseminación artificial (IA), ha permitido promover el mejoramiento genético de los animales mediante la selección de mejores características (Büyükleblebici et al., 2014). Este aspecto ha generado un aumento en la productividad por unidad de área y una mayor eficiencia en la producción de proteína animal (Hristov et al., 2013). Además, esta mejora paralela de los sistemas productivos puede coadyuvar en la disminución de emisiones de metano a causa de la fermentación entérica de los animales (Sakatani, 2022). En ese contexto, el semen de los machos con alto valor genético y productivo debe ser optimizado para obtener mayor número de dosis seminales, que permita inseminar el mayor número de hembras posible (Raheja et al., 2018). Desde un punto de vista biológico, la congelación del material genético del macho es un mecanismo importante para la conservación de las especies animales a nivel mundial (Castillo et al., 2021; Yang et al., 2020).

Los primeros estudios que se realizaron para entender el efecto de las bajas temperaturas sobre las células espermáticas se remontan al siglo XVIII en Italia, cuando Lazzaro Spallanzani comprobó que los espermatozoides al ser sometidos a bajas temperaturas, podían mantener la capacidad de moverse (Sztein et al., 2018). Los primeros reportes documentados de la utilización de germoplasma criopreservado en las principales especies ganaderas datan de los años 60s del siglo XX (Curry, 2000). Sin embargo, el uso constante de este tipo de biotecnología reproductiva ha permitido que su aplicabilidad se haya implementado en otras especies no tan comunes, por ejemplo, abejas

(Gül et al., 2017; Gulov et al., 2023), dromedarios (Malo et al., 2020), camélidos sudamericanos (Fumuso et al., 2021; Stuart et al., 2019), bisonte (Vilela et al., 2017), oso pardo (Gomes-Alves et al., 2014), incluso en especies amenazadas de riesgo de extinción como el elefante asiático (Arnold et al., 2017), el tigre siberiano (Ibrahim et al., 2022) o el rinoceronte (Hermes et al., 2018).

La disminución en el metabolismo de las células espermáticas mediante la reducción de la temperatura (choque por frío) provoca alteraciones en sus componentes y estructura celular, lo que compromete su funcionalidad posterior y limita su capacidad fecundante (Gürler et al., 2016; Moore & Hasler, 2017; Ozimic et al., 2023). Estos daños están relacionados con choques bruscos de temperaturas, lo que provoca la formación de cristales dentro de la célula y el estrés osmótico. Debido a esto, las tasas de eficiencia de la técnica de congelación se han mantenido bajas (Hezavehei et al., 2018; Sharafi, Borghei-Rad, et al., 2022). Por este motivo, se han estudiado mecanismos para optimizar el proceso de congelación que reduzca el estrés físico y químico en el gameto masculino durante el proceso de conservación.

El uso de sustancias crio protectoras (Fumuso et al., 2021; Seshoka et al., 2016), antibióticos que limiten el crecimiento de microorganismos (Schulze et al., 2017), el uso de polisacáridos (Chung et al., 2019; Viudes de Castro et al., 2021), antioxidantes que limitan el efecto del estrés oxidativo (Branco et al., 2010; ChaithraShree et al., 2020; Makris et al., 2023; Silvestre et al., 2021). En relación con las metodologías empleadas, el manejo de los tiempos de equilibrio (Martín et al., 2023; Pieper et al., 2023; Shah et al., 2016), la selección de espermias por reotaxis y termotaxis (Nagata et al., 2019) y la implementación de gradientes de centrifugación o centrifugación coloidal (Brugnon et al., 2013; Lima-Verde et al., 2022; Malvezzi et al., 2014); son parte de las técnicas que se han estudiado en los últimos años. Estos estudios favorecen la selección y mejoras en los procesos de conservación.

Una de las principales limitaciones del proceso de criopreservación es la poca estandarización metodológica desde la colecta del semen hasta el descongelado de la pajilla en los diferentes centros de investigación. Esto incide sobre la repetibilidad de la técnica y provoca la disminución en la eficiencia de los procesos de congelación espermática (Yáñez-Ortiz et al., 2022). El objetivo de este trabajo fue revisar el estado del arte sobre la criopreservación de espermatozoides de especies ganaderas y su posible contribución sobre el desarrollo sostenible.

Metabolismo celular

Durante el metabolismo celular, el espermatozoide requiere producir energía para completar sus funciones y, durante el transporte de electrones en la mitocondria, se generan especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) como el superóxido, peróxido de hidrógeno y el hidroxilo (Schieber & Chandel, 2014). Los ROS son precursores del estrés oxidativo para los espermatozoides y están relacionados con la fertilidad (Champroux et al., 2016; Marques et al., 2023; Pintus & Ros-Santaella, 2021). Durante la gametogénesis, los espermatozoides están expuestos a sufrir de estrés oxidativo por ROS.

Las células espermáticas poseen una capacidad antioxidante que les permite tolerar el estrés oxidativo, sin embargo, durante la conservación, se desencadena un mayor estrés oxidativo que afecta el ADN nuclear y puede causar problemas de infertilidad (Agarwal et al., 2009; Catalán et al., 2024). Estudios previos han demostrado que las principales fuentes de ROS para los espermatozoides provienen de espermatozoides anormales, inmaduros o afuncionales (Martinez-Alborcia et al., 2012). Los altos contenidos de leucocitos en el tracto reproductivo del macho o producto del proceso natural de la respiración celular en las mitocondrias, también favorecen este fenómeno (Aitken & Baker, 2006; Roca et al., 2013; Tvrdá et al., 2018).

En el proceso de formación de los espermatozoides, estos pierden parte de los antioxidantes que contienen a nivel del citoplasma producto de la división celular (Sabeti et al., 2016). Sin embargo, a nivel celular no solo se producen radicales relacionados con el oxígeno, también actúan otros radicales libres, que se relacionan con el

nitrógeno (Phaniendra et al., 2015). Estos radicales nitrogenados son el óxido nítrico y el peroxinitrito, que cumplen un rol importante como principales agentes en la degradación de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ford, 2004).

La membrana de la célula espermática es rica en ácidos grasos polinsaturados, los cuales son degradados por los ROS por medio de la peroxidación lipídica (Champroux et al., 2016; Sabeti et al., 2016). La presencia de ROS es un elemento necesario para el cumplimiento de algunas funciones específicas de la célula espermática, como son el proceso de división, la capacitación, la reacción del acrosoma, la maduración y la potencial capacidad de fertilizar (Qamar et al., 2023). Durante el desarrollo de las células espermáticas se producen compuestos o enzimas que tienen la función antioxidante, lo que permite la disminución del impacto de los ROS sobre las células.

A nivel epididimario, los antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos abarcan complejos sistemas de enzimas que se regulan de acuerdo con la necesidad de las células, como la enzima glutatión peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión S-transferasa, tioredoxina reductasa, peroxirredoxinas y hemo oxigenasa (Córdova-Izquierdo et al., 2010). Mientras los antioxidantes no enzimáticos son moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas que se encuentran en la estructura celular, como el glutatión, vitaminas D, E, C y otros compuestos fenólicos que cumplen la función de mecanismo de defensa de la célula, para evitar la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Zeitoun & Al-Damegh, 2015).

La alta incidencia de estrés oxidativo en las células espermáticas es una de las principales causas de los problemas de infertilidad en mamíferos (Atig et al., 2017; Makris et al., 2023). En los procesos de criopreservación de los espermatozoides estos también sufren alteraciones en su metabolismo. Este mecanismo es conocido como crio capacitación, debido a que la disminución de la temperatura durante la congelación de las células induce a una capacitación adelantada de los espermatozoides, lo que favorece alteraciones en las características funcionales de las células (Ogata et al., 2022).

Criopreservación en especies ganaderas

La adición de un crioprotector a una muestra de semen permite su congelación y almacenamiento a temperaturas por debajo de los 0 °C (Raad et al., 2018). La técnica se puede considerar como una forma de optimizar el uso de los animales (Khan et al., 2021), debido a que permite mantener material genético de alto valor por largos periodos (Simonik et al., 2022), favorece la distribución del material genético y cuidado de la biodiversidad (Kalwar et al., 2022). Sin embargo, se estimulan la formación de radicales libres que promueven la peroxidación lipídica de la membrana, que provocan daños a nivel estructural y molecular, y comprometen la capacidad funcional y fecundante del gameto masculino (El-Seadawy et al., 2022; Gürlér et al., 2016; Marques et al., 2023; Ozimic et al., 2023).

La criopreservación también estimula la cantidad de radicales libres en el semen y hace que las células espermáticas presenten afectaciones, lo cual compromete las características que definen la calidad del esperma, como por ejemplo la integridad de la membrana, la movilidad o el nivel de fragmentación del ADN nuclear espermático a la descongelación (Kaeoket & Chanapiwat, 2023; Raad et al., 2018). Algunos trabajos en bovinos indican que el efecto de la congelación sobre las células espermáticas puede ser variable en función del grado de interacción con factores como la raza o las condiciones medioambientales (Saranholi et al., 2021). En algunas especies ganaderas cuyas células presentan mayor susceptibilidad a factores extrínsecos, relacionados con los cambios repentinos de temperaturas y las fuentes externas de ROS, no se han podido estandarizar protocolos de criopreservación oportunos, que sean capaces de mantener la funcionalidad espermática y no influyan manera negativa en los porcentajes de preñez de las granjas (Kajabova et al., 2020).

Factores que influyen de forma positiva y negativa en el proceso

Los parámetros de morfometría del espermatozoide de los mamíferos, pueden ser utilizados como predictores de la capacidad que presenten estos a los procesos de congelación (Maroto-Morales et al., 2016; Villaverde-Morcillo et al., 2017). Algunos trabajos en los que se han evaluado parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide señalan un efecto de los procesos de congelación sobre el tamaño y forma de las células espermáticas a la descongelación (Viquez et al., 2023). En consecuencia, se ha encontrado que el tamaño y la forma de la célula está relacionado con la capacidad que estas tengan para poder resistir los efectos del choque por frío (Esteso et al., 2006).

Los espermatozoides cuyo tamaño de cabeza es más pequeño y de forma más elíptica, tienden a presentar mayor resistencia a los procesos de conservación, lo que permite hacer una selección de los machos con mayor potencial (Esteso et al., 2006). En años recientes, se ha encontrado que variables como la hiperactivación que presenten los espermatozoides congelados-descongelados, está relacionada con los parámetros de velocidad, progresividad y ondulación en la trayectoria espermática, y esto puede ser un indicador de resistencia a los procesos criogénicos en animales con fertilidad alta *a priori* (Marques et al., 2023).

Algunos antioxidantes pueden mitigar los posibles efectos negativos de la formación de radicales libres y fuentes de ROS intracelular asociadas al incremento del estrés oxidativo. Sin embargo, estudios recientes realizados en burro, donde se evaluó la capacidad antioxidante, demostraron que la resistencia de los espermatozoides al estrés oxidativo producido por la criopreservación, está en función de la presencia de las enzimas superóxido dismutasa y la paraoxonasa 1 (Catalán et al., 2022). En cerdos, los parámetros post-descongelación como la movilidad espermática, se asocian a la superóxido dismutasa, la capacidad equivalente al trolox (análogo de la vitamina E) y de reducción férrica del plasma; mientras que la viabilidad con los niveles de glutatión peroxidasa, paraoxonasa 1, al trolox y la superóxido dismutasa (Li, Barranco, et al., 2018).

Antes y durante el proceso de la criopreservación y dilución del semen, se deben utilizar sustancias que sean capaces de aportar un medio nutritivo y mantener las características normales del eyaculado a la descongelación (Raheja et al., 2018; Sathe, 2021). La elección del diluyente es importante, debido a que este puede influir sobre los patrones de movilidad (Araya-Zúñiga et al., 2023). En bovinos se ha demostrado que la elección del diluyente y los agentes crioprotectores, son un factor importante que puede afectar la distribución de subpoblaciones espermáticas, al caracterizar estas por medio de parámetros morfométricos de tamaño y forma de la cabeza (Viquez et al., 2023), así como de patrones cinemáticos (Viquez et al., 2021).

En la actualidad, los diluyentes a base de soya son muy utilizados, debido a que, en muchos países, el uso de componentes de origen animal como yema de huevo o leche son restringidos por el riesgo potencial de contaminación microbiológica que estos pueden representar (Bustani & Baiee, 2021; Lima-Verde et al., 2018). Otros trabajos han sugerido que los componentes de origen animal presentes en los medios de dilución seminal pueden causar una considerable afectación sobre la capacidad de fertilizar de los espermatozoides, debido a la interacción de estos con compuestos producidos por las células muertas que fomentan los ROS y afectan la viabilidad, movilidad y la integridad de la membrana (Akhter et al., 2011; Masoudi et al., 2017). La dilución de las muestras previene la formación de aglutinaciones y genera un aumento en la actividad metabólica celular, que puede aumentar la movilidad de los espermatozoides que se han conservado (Gomes-Alves et al., 2014; Slanina et al., 2015).

La centrifugación del eyaculado es un paso que se utiliza para hacer una selección de los espermatozoides más aptos para poder fertilizar el ovocito. A través de este proceso, se eliminan los espermatozoides no viables, fragmentos celulares y el plasma seminal, que resultan en una fuente endógena de ROS extracelular (Sieme & Oldenhof, 2015) e inclusive se puede hacer un control de agentes externos de origen microbiológico dentro del eyaculado (Cojkic et al., 2024). Por esta razón, al implementar este paso dentro del protocolo se permite que solo

los espermatozoides que presenten buenas características de movilidad, cinética, morfología e integridad de la membrana, sean los que se usen en las técnicas de reproducción asistida (Morrell & Rodríguez-Martínez, 2016).

Sin embargo, hay evidencia que señala que al congelar células espermáticas extraídas de la cola del epidídimo, el proceso de centrifugación podría ser contraproducente, debido a que no muestra un efecto significativo sobre las variables asociadas con el movimiento, la integridad de la célula y la fragmentación del ADN del espermatozoide a la descongelación (Ellerbrock et al., 2017). Una ventaja de la centrifugación en casos donde los eyaculados provengan de individuos cuya calidad seminal ya es conocida, es que favorece la selección espermática (Brugnon et al., 2013; Hoogewijs et al., 2011; Gloria et al., 2016). Sin embargo, la centrifugación podría encarecer los costos de producción de dosis seminales, aumentar el tiempo de procesar las muestras y disminuir la cantidad de células disponibles para producir las dosis seminales (Ellerbrock et al., 2017).

En humanos se ha reportado que la centrifugación previa al enfriamiento de los espermatozoides, ocasiona un aumento significativo en la movilidad progresiva que exhiben las células al ser analizadas, sin embargo, podrían afectar la concentración de espermatozoides (Androni et al., 2021). En porcino, el estudio de la centrifugación de las dosis seminales posterior a su descongelación, ha demostrado un efecto negativo sobre la movilidad total y progresiva, con valores de disminución entre 5 a 10 % (Almubarak et al., 2021). Otros trabajos han demostrado que la incorporación de solo una centrifugación coloidal antes de la criopreservación, tiene un efecto positivo sobre la incidencia de espermatozoides con el ADN fragmentado durante las primeras cuatro horas de incubación, con índices de fragmentación del ADN por debajo del 20 % (Gutiérrez-Cepeda et al., 2012).

El efecto del uso de antioxidantes en los procesos de congelación de espermatozoides, ha sido objeto de estudio en algunas especies como peces (Félix et al., 2021; Ruan et al., 2024), verraco (He et al., 2020; Kaeoket & Chanapiwat, 2023), carnero (Akhter et al., 2023; Carriço et al., 2023), humano (Atig et al., 2017; Branco et al., 2010), burro (Catalán et al., 2022) y toro (ChaithraShree et al., 2020; Sharafi, Blondin, et al., 2022).

Los antioxidantes disminuyen el efecto negativo de los ROS durante la criopreservación espermática, y permite conservar su capacidad fecundante (Ogata et al., 2022). Estudios recientes en la especie caprina, demuestran que la adición de glutatión y melatonina mejoran las características de los espermatozoides post-congelación (Carriço et al., 2023).

No obstante, dentro de sus conclusiones los autores señalan que es necesario la optimización de las proporciones de cada uno de los antioxidantes, así como la combinación de estos. En bovinos se ha probado el efecto de la adición de niveles de melatonina en la muestra espermática previo a la criopreservación, lo que permite disminuir el daño por el choque térmico sobre las células y mejorar los parámetros de movilidad, cinética y la integridad tanto de la membrana plasmática como del acrosoma a la descongelación (ChaithraShree et al., 2020). Otros trabajos realizados en humanos han usado el resveratrol (RSV) y el ácido ascórbico como agentes antioxidantes para prevenir la degradación del ADN nuclear espermático posterior a la congelación de las células (Branco et al., 2010).

La adición de varios niveles de RSV para disminuir la peroxidación lipídica y cuantificado los niveles de malondialdehído en espermatozoides de verraco diluidos en una solución compuesta de lactosa-yema de huevo, provocó una mayor presencia del malondialdehído respecto a su inclusión, sin embargo, entre los diferentes niveles de RSV utilizados no se encontraron diferencias significativas (Kaeoket & Chanapiwat, 2023). Un estudio similar, también realizado en verraco, mostró resultados muy parecidos, al comparar el uso del RSV al congelar las células, sin embargo, aunque se mejoró la cantidad de células con acrosoma y las membranas intactas, no se presentó un efecto positivo sobre la movilidad de los espermatozoides (He et al., 2020).

En semen de ganado bovino se ha utilizado el RSV como agente para prevenir el efecto del estrés oxidativo, en animales con crio tolerancia ya conocida. En este trabajo los autores determinaron que al suplementar las

muestras seminales previo a la congelación con 0,1 nM del RSV, mejoró de forma significativa la movilidad total y progresiva, la linealidad y la actividad mitocondrial de los espermatozoides en los casos en donde los animales presentaban baja tolerancia de los espermatozoides al proceso de congelación (Sharafi, Blondin, et al., 2022). Otras evidencias en bovino, han indicado que el uso de RSV mejora la capacidad fecundante de un espermatozoide al evaluar la formación y la calidad del blastocito posterior a la fecundación *in vitro* (Li, Zhao, et al., 2018).

Relación con otras tecnologías de reproducción asistida

La congelación del espermatozoide de los animales se considera una técnica de reproducción asistida, sin embargo, esta con frecuencia se asocia con otra biotecnología reproductiva como la inseminación artificial (Nagata et al., 2019). La combinación de estas técnicas ha permitido un efecto positivo sobre los sistemas ganaderos lo que mejora la productividad (Kalwar et al., 2022; Ugur et al., 2019), mediante la distribución global de material genético de elite y la posible prevención de enfermedades reproductivas (Masoudi et al., 2017). Por esa razón, se les ha asignado el calificativo de revolucionarias en los sistemas de reproducción animal (Sathe, 2021), dado que preservan la diversidad genética y, en casos de especies con alta presión por actividad humana, ayudan a mantener poblaciones sostenibles en el tiempo (Di Iorio et al., 2019). Sin embargo, es necesaria la estandarización de los protocolos de congelación que permitan mejorar los índices de preñez que se obtienen producto de la inseminación artificial con semen congelado-descongelado (Chung et al., 2019; Kajabova et al., 2020).

Implicaciones como respuesta al cambio climático y la sostenibilidad

A través de los procesos de optimización de las técnicas de criopreservación espermática, se puede conservar germoplasma de animales que presenten mayor productividad, mejores características de adaptabilidad a las condiciones del trópico, al cambio climático e incluso la conservación de material genético de razas criollas o locales. A nivel ambiental, se ha documentado que la mejora en los sistemas ganaderos puede contribuir a disminuir las emisiones de metano por la fermentación entérica (Sakatani, 2022). Además, si se extrapola en términos productivos, se puede aumentar el rendimiento del ganado por unidad de área, mediante una mejor selección de animales con características deseables de adaptabilidad y de eficiencia alimenticia (Hristov et al., 2013). La preservación del germoplasma es importante para la conservación de las especies silvestres y conservar la diversidad genética de las especies, cuyo estatus a nivel global se puede considerar en peligro (Sandfoss et al., 2022).

A nivel mundial existe preocupación por la pérdida de recursos zoo genéticos considerados como criollos, los cuales han sobrevivido durante muchos años a procesos de selección natural, y se consideran fundamentales tanto como fuente de alimento para las poblaciones humanas de zonas rurales, así como un medio de apoyo para las labores agrícolas dado su elevado grado de adaptación a las condiciones locales, producto de años de selección natural (Vanvanhossou et al., 2021; Vázquez Gil & Guevara Viera, 2021). Además, poseen un valor cultural e histórico de un país o región (da Silva, 2014). En América latina, la mayoría de los recursos zoo genéticos bovinos autóctonos, se han perdido por la poca importancia que se le ha dado a la conservación de estos recursos, debido a un enfoque de producción, que se basa en el establecimiento de cruzamientos absorbentes con razas introducidas (Martínez-Aguilar, 2020; Mujica, 2009).

Las razas criollas en la gran mayoría de los casos son reemplazadas por materiales genéticos del exterior, categorizados como de “elite”. Sin embargo, a nivel práctico estas razas importadas bajo las condiciones actuales de cambio climático y condiciones ambientales imperantes en el trópico no son eficientes en términos productivos

y ambientales. En este contexto, este fenómeno se puede explicar bajo el argumento de que el material genético que se distribuye e introduce en los sistemas productivos alrededor del mundo es bueno en términos productivos, pero en las condiciones de su lugar de procedencia (Mirkena et al., 2010).

En Sudamérica, se han producido avances considerables en el estudio del esperma de camélidos de la región, los cuales han permitido realizar la conservación del germoplasma mediante la criopreservación (Fumuso et al., 2021; García et al., 2021; Stuart et al., 2019). En España, la optimización de protocolos de conservación mediante vitrificación de la raza de burro de Andalucía ha sido exitosa, también ha favorecido la implementación de otras biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (Hidalgo et al., 2020). En la región de Molise en Italia, se ha criopreservado semen para la creación de bancos de germoplasma que permitan restablecer los números poblacionales de la trucha mediterránea marrón (Di Iorio et al., 2019), una especie nativa de los ríos de esta región.

En Colombia, se han realizado estudios exploratorios de la técnica de conservación de germoplasma en toros de la raza criolla Sanmartinero (Medina-Robles et al., 2007), un caso similar se ha documentado en Indonesia con la investigación de diferentes crioprotectores sobre la conservación de espermatozoides de toros de la raza de ganado Bali (Saili et al., 2023). En Sudáfrica, se han realizado notables avances en la conservación del material genético de la raza de ganado indígena Nguni, enfocados en la estandarización de los protocolos mediante el estudio del efecto del número de congelaciones (Mphaphathi & Nedambale, 2021) y el uso de crioprotectores (Seshoka et al., 2016). El interés por la conservación de material zoo genético de cerdos nativos del sur de África, ha sido plasmado mediante trabajos pioneros enfocados en la estandarización de los protocolos de congelación en la raza de cerdo Windsnyer (Thema et al., 2023). En estos casos, aunque el objetivo no era la conservación de la raza, pueden ser estudios pioneros que puedan brindar una base metodológica validada que sirva como punto de partida para la conservación de otras especies.

Conclusiones

Las metodologías utilizadas para la preservación del material genético de animales de importancia ganadera han sido amplias. La susceptibilidad de las células espermáticas de los mamíferos a los procesos criogénicos de conservación provoca que se disminuya la funcionalidad y viabilidad lo que limita la fertilidad del gameto masculino. La utilización de diluyentes específicos, eliminación de células no viables, mediante centrifugación, y la adición de sustancias antioxidantes, permiten mejorar la calidad del semen a la descongelación.

Es necesario enfocar la investigación en la estandarización de protocolos de congelación bajo condiciones extrínsecas del individuo que son adversas relacionadas con factores nutricionales y ambientales, como una posible alternativa para el aumento de la productividad de los sistemas ganaderos bajo las condiciones del cambio climático, y que constituyan una herramienta para la preservación de la biodiversidad zoo genética que permita alcanzar la sostenibilidad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica por financiar este estudio mediante el proyecto de investigación VIE-2151-083 “*Optimización de la conservación y búsqueda de parámetros de la fertilidad en espermatozoides de animales de interés productivo*”. El primer autor agradece al programa de maestría en Ciencia y Tecnología para la sostenibilidad y a la Dirección de Posgrados del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Referencias

- Agarwal, A., Varghese, A. C., & Sharma, R. K. (2009). Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. In O. Park-Sarge, & T. Curry (Eds.), *Methods in molecular biology* (pp. 377–402). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-378-7_24
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1–2), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., & Khalid, M. (2011). *In Vitro* Evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell®), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 45–49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01561.x>
- Akhter, S., Zubair, M., Mahmood, M., Andrabi, S. M. H., Hameed, N., Ahmad, E., & Saleemi, M. K. (2023). Effects of vitamins C and E in tris citric acid glucose extender on chilled semen quality of Kail ram during different storage times. *Scientific Reports*, 13(1), Article 18123. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43831-2>
- Almubarak, A. M., Kim, W., Abdelbagi, N. H., Balla, S. E., Yu, I.-J., & Jeon, Y. (2021). Washing solution and centrifugation affect kinematics of cryopreserved boar semen. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 36(2), 65–75. <https://doi.org/10.12750/jarb.36.2.69>
- Androni, D. A., Dodds, S., Tomlinson, M., & Maalouf, W. E. (2021). Is pre-freeze sperm preparation more advantageous than post-freeze? *Reproduction and Fertility*, 2(1), 17–25. <https://doi.org/10.1530/RAF-20-0041>
- Araya-Zúñiga, I., Sevilla, F., Barquero, V., & Valverde, A. (2023). The effect of extender, age, and bovine sexual status on the sperm kinematics. *Agronomía Mesoamericana*, 34(3), Article 52597. <https://doi.org/10.15517/am.2023.52597>
- Arnold, D. M., Gray, C., Roth, T. L., Mitchell, S., & Graham, L. H. (2017). A simple, field-friendly technique for cryopreserving semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). *Animal Reproduction Science*, 182, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.003>
- Atig, F., Kerkeni, A., Saad, A., & Ajina, M. (2017). Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(3), 373–381. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9936-x>
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235–237. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.012>
- Brugnon, F., Ouchchane, L., Pons-Rejraji, H., Artonne, C., Farigoule, M., & Janny, L. (2013). Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Human Reproduction*, 28(8), 2045–2057. <https://doi.org/10.1093/humrep/det253>
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>

- Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, *150*(3–4), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>
- Carrigo, C., Barbas, J. P., Pimenta, J., & Simões, J. (2023). Effect of *in vitro* addition of melatonin and glutathione on seminal parameters of rams in diluted semen and after thawing. *Veterinary Sciences*, *10*(7), Article 446. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070446>
- Castillo, A., Lenzi, C., Pirone, A., Baglini, A., Cerolini, S., Iaffaldano, N., Sartore, S., Russo, C., Schiavone, A., & Di Cossato, M. M. F. (2021). Optimization of a protocol for the cryopreservation of sperm in pellets for the common pheasant (*Phasianus colchicus mongolicus*). *Animals*, *11*(8), Article 2472. <https://doi.org/10.3390/ani11082472>
- Catalán, J., Yáñez-Ortiz, I., Torres-Garrido, M., Ribas-Maynou, J., Llavenera, M., Barranco, I., Yeste, M., & Miró, J. (2024). Impact of seminal plasma antioxidants on DNA fragmentation and lipid peroxidation of frozen–thawed horse sperm. *Antioxidants*, *13*(3), Article 332. <https://doi.org/10.3390/antiox13030322>
- Catalán, J., Yáñez-Ortiz, I., Tvarijonavičiute, A., González-Arostegui, L. G., Rubio, C. P., Yeste, M., Miró, J., & Barranco, I. (2022). Impact of seminal plasma antioxidants on donkey sperm cryotolerance. *Antioxidants*, *11*(2), Article 417. <https://doi.org/10.3390/antiox11020417>
- ChaitraShree, A. R., Ingole, S. D., Dighe, V. D., Nagvekar, A. S., Bharucha, S. V., Dagli, N. R., Kekan, P. M., & Kharde, S. D. (2020). Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science*, *6*(2), 177–186. <https://doi.org/10.1002/vms3.224>
- Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: Resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology*, *26*, Article 17. <https://doi.org/10.1186/s12610-016-0044-5>
- Chung, E. L. T., Nayan, N., Nasir, N. S. M., Hing, P. S. A., Ramli, S., Rahman, M. H. A., & Kamalludin, M. H. (2019). Effect of honey as an additive for cryopreservation on bull semen quality from different cattle breeds under tropical condition. *Journal of Animal Health and Production*, *7*(4), 171–178. <https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2019/7.4.171.178>
- Cojkcic, A., Hansson, I., Johannisson, A., Axner, E., & Morrell, J. M. (2024). Single layer centrifugation as a method for bacterial reduction in bull semen for assisted reproduction. *Veterinary Research Communications*, *48*(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10178-y>
- Córdova-Izquierdo, A., Saltijeral Oaxaca, J., Ruiz Lang, G., Xolalpa Campos, V., Cortés Suárez, S., Peña Betancourt, S. D., Córdova-Jiménez, C., Córdova-Jiménez, M., Méndez Mendoza, M., Crispín Huerta, R., Juárez Mosqueda, M., & Guerra Liera, J. E. (2010). Estrés oxidativo en gametos-Oxidative stress in gametes. *Revista Electronica Veterinaria*, *11*(7), 1–32. <https://www.veterinaria.org/index.php/REDVET/issue/view/1>
- Curry, M. R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, *5*, 46–52.
- da Silva, A. (2014). El plan de acción mundial de la FAO sobre los recursos zoogenéticos y su aplicación en Latinoamérica y el Caribe. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, *48*(1), 35–41.
- Di Iorio, M., Esposito, S., Rusco, G., Roncarati, A., Miranda, M., Gibertoni, P. P., Cerolini, S., & Iaffaldano, N. (2019). Semen cryopreservation for the Mediterranean brown trout of the Biferno River (Molise-Italy): Comparative study on the effects of basic extenders and cryoprotectants. *Scientific Reports*, *9*, Article 9703. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45006-4>

- Ellerbrock, R. E., Prell, M. J., Stewart, J. L., Bojko, M. S., Lima, F. S., & Canisso, I. F. (2017). Comparison of Centrifugation and Noncentrifugation Methods to Cryopreserve Stallion Epididymal Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 50, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.11.005>
- El-Seadawy, I. E., Kotp, M. S., El-Maaty, A. M. A., Fadl, A. M., El-Sherbiny, H. R., & Abdelnaby, E. A. (2022). The impact of varying doses of moringa leaf methanolic extract supplementation in the cryopreservation media on sperm quality, oxidants, and antioxidant capacity of frozen-thawed ram sperm. *Tropical Animal Health and Production*, 54(6), Article 344. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03344-y>
- Esteso, M. C., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Quintero-Moreno, A. A., & Garde, J. J. (2006). Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *Journal of Andrology*, 27(5), 662–670. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000489>
- Félix, F., Oliveira, C. C. V., & Cabrita, E. (2021). Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. *Antioxidants*, 10(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Ford, W. C. L. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 10(5), 387–399. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh034>
- Fumuso, F. G., Bertuzzi, M. L., Velásquez González, N., Miragaya, M. H., & Carretero, M. I. (2021). Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(7), 958–964. <https://doi.org/10.1111/rda.13937>
- García, W., Maxi, E., Macedo, V., Ampuero, E., & Malaga, J. (2021). Cryopreservation of alpaca spermatozoa obtained via post copula in a tris extender with egg yolk from three avian species. *Spermova*, 11(1), 11–16. <https://doi.org/10.18548/ASPE/0009.02>
- Gloria, A., Carluccio, A., Wegher, L., Robbe, D., Befacchia, G., & Contri, A. (2016). Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, Article 30. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0088-6>
- Gomes-Alves, S., Alvarez, M., Nicolas, M., Lopez -Urueña, E., Martínez-Rodríguez, C., Borragan, S., de Paz, P., & Anel, L. (2014). Use of commercial extenders and alternatives to prevent sperm agglutination for cryopreservation of brown bear semen. *Theriogenology*, 82(3), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.015>
- Gül, A., Şahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., & Sheppard, W. S. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.020>
- Gulov, A. N., Berezin, A. S., Larkina, E. O., Saltykova, E. S., & Kaskinova, M. D. (2023). Creation of a biobank of the sperm of the honey bee drones of different subspecies of *Apis mellifera* L. *Animals*, 13(23), Article 3684. <https://doi.org/10.3390/ani13233684>
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>
- Gutiérrez-Cepeda, L., Fernández, A., Crespo, F., Ramírez, M. Á., Gosálvez, J., & Serres, C. (2012). The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54, Article 72 <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-72>

- He, W. H., Zhai, X. H., Duan, X. J., & Di, H. S. (2020). Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing. *Journal of Zhejiang University: Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 21(6), 485–494. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900520>
- Hermes, R., Hildebrandt, T. B., & Göritz, F. (2018). Cryopreservation in rhinoceros—setting a new benchmark for sperm cryosurvival. *PLoS ONE*, 13(7), Article e0200154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200154>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hidalgo, M., Diaz-Jimenez, M., Consuegra, C., Pereira, B., & Dorado, J. (2020). Vitrification of donkey sperm: Is it better using permeable cryoprotectants? *Animals*, 10(9), Article 1462. <https://doi.org/10.3390/ani10091462>
- Hoogewijs, M., Morrell, J., Van Soom, A., Govaere, J., Johannisson, A., Piepers, S., De Schauwer, C., De Kruif, A., & De Vliegher, S. (2011). Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, 43(Supp. 40), 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00489.x>
- Hristov, A. N., Ott, T., Tricarico, J., Rotz, A., Waghorn, G., Adesogan, A., Dijkstra, J., Montes, F., Oh, J., Kebreab, E., Oosting, S. J., Gerber, P. J., Henderson, B., Makkar, H. P. S., & Firkins, J. L. (2013). SPECIAL TOPICS-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5095–5113. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6585>
- Hungerford, A., Bakos, H. W., & Aitken, R. J. (2023). Sperm cryopreservation: current status and future developments. *Reproduction, Fertility, and Development*, 35(3), 265–281. <https://doi.org/10.1071/RD22219>
- Ibrahim, S., Talha, N. A. H., Kim, J., Jeon, Y., & Yu, I. (2022). Cryopreservation of Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) epididymal spermatozoa: pilot study of post-thaw sperm characteristics. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 37(2), 130–135. <https://doi.org/10.12750/jarb.37.2.130>
- Kaeoket, K., & Chanapiwat, P. (2023). The beneficial effect of resveratrol on the quality of frozen-thawed boar sperm. *Animals*, 13(18), Article 2829. <https://doi.org/10.3390/ani13182829>
- Kajabova, S., Silva, H., Valadao, L., & Moreira, F. (2020). Artificial insemination and cryopreservation of boar semen: current state and problematics. *Open Science Journal*, 5(2), 1–12. <https://osjournal.org/ojs/index.php/OSJ/article/view/2353/0>
- Kalwar, Q., Chu, M., Korejo, R. A., Soomro, H., & Yan, P. (2022). Cryopreservation of yak semen: A comprehensive review. *Animals*, 12(24), Article 3451. <https://doi.org/10.3390/ani12243451>
- Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., & Zhang, Y. (2021). Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 609180 <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
- Li, C. Y., Zhao, Y. H., Hao, H. S., Wang, H. Y., Huang, J. M., Yan, C. L., Du, W. H., Pang, Y. W., Zhang, P. P., Liu, Y., Zhu, H. Bin, & Zhao, X. M. (2018). Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific Reports*, 8, Article 7603. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25687-z>
- Li, J., Barranco, I., Tvarijonavičiute, A., Molina, M. F., Martínez, E. A., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., & Roca, J. (2018). Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 107, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.035>

- Lima-Verde, I. B., Johannisson, A., Ntallaris, T., Al-Essawe, E., Al-Kass, Z., Nongbua, T., Dórea, F., Lundeheim, N., Kupisiewicz, K., Edman, A., & Morrell, J. M. (2018). Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 127–136. <https://doi.org/10.1111/rda.13080>
- Lima-Verde, I., Hurri, E., Ntallaris, T., Johannisson, A., Stålhammar, H., & Morrell, J. M. (2022). Sperm quality in young bull semen can be improved by single layer centrifugation. *Animals*, 12(18), Article 2435. <https://doi.org/10.3390/ani12182435>
- Madhusoodan, A. P., Sejian, V., Rashamol, V. P., Savitha, S. T., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2019). Resilient capacity of cattle to environmental challenges – An updated review. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 7(3), 104–118. <https://doi.org/10.31893/2318-1265jabb.v7n3p104-118>
- Makris, A., Alevra, A. I., Exadactylos, A., & Papadopoulos, S. (2023). The role of melatonin to ameliorate oxidative stress in sperm cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), Article 15056. <https://doi.org/10.3390/ijms242015056>
- Malo, C., Crichton, E. G., & Skidmore, J. A. (2020). Preservation of the spermatozoa of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) by chilling and freezing: The effects of cooling time, extender composition and catalase supplementation. *Theriogenology*, 153, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.043>
- Malvezzi, H., Sharma, R., Agarwal, A., Abuzenadah, A. M., & Abu-Elmagd, M. (2014). Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: A controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, Article 121. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-121>
- Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., Ramón, M., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M., Soler, A., & Garde, J. (2016). Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 863–870. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187581>
- Marques, J. C. C., Cezar, A. R. R., do Nascimento, A. D., da Silva, J. P., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., & Câmara, D. R. (2023). Relationship between Na/K-ATPase in thawed sperm and fertility of Angus bulls. *Animal Reproduction*, 20(4), Article e20220066 <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0066>
- Martín, A., Castaño, C., O'Brien, E., Toledano-Díaz, A., Guerra, R., Gómez-Guillamón, F., & Santiago-Moreno, J. (2023). Equilibration time improves the sperm variables of wild ruminant ejaculated and epididymal sperm cryopreserved by ultra-rapid freezing. *Cryobiology*, 113, Article 104579. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104579>
- Martínez-Aguilar, E. (2020). Reseña del origen y desaparición de los bovinos criollos en El Salvador, el primer paso para una posible reintroducción. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Agronómicas de La Universidad de El Salvador*, 3(16), 118–129. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10840488>
- Martinez-Alborcia, M. J., Valverde, A., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., & Roca, J. (2012). Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS ONE*, 7(5), Article e36550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>
- Masoudi, R., Zare Shahneh, A., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A., & Sharafi, M. (2017). Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*, 74, 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>
- Medina-Robles, V., Sánchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaria, Y., & Cruz-Casallas, P. (2007). Criopreservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Revista ORINOQUIA*, 11(1), 75–86.

- Mirkena, T., Duguma, G., Haile, A., Tibbo, M., Okeyo, A. M., Wurzinger, M., & Sölkner, J. (2010). Genetics of adaptation in domestic farm animals: A review. In *Livestock Science*, 132(1–3), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.003>
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2016). Colloid centrifugation of semen: applications in assisted reproduction. *American Journal of Analytical Chemistry*, 7(8), 597–610. <https://doi.org/10.4236/ajac.2016.78055>
- Mphaphathi, M. L., & Nedambale, T. L. (2021). Effect of repeated freezing and thawing on nguni sperm parameters evaluated by computer assisted sperm analyzer system. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2021.1.6>
- Mujica, F. (2009). Diversidad y conservación de los recursos zoogenéticos de país. *Agro Sur*, 37(3), 134–175.
- Nagata, M. P. B., Egashira, J., Katafuchi, N., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Hashiyada, Y., & Yamashita, K. (2019). Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, Article 91. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0395-9>
- Ogata, K., Imai, A., Sato, S., Nishino, K., Watanabe, S., Somfai, T., Kobayashi, E., & Takeda, K. (2022). Effects of reduced glutathione supplementation in semen freezing extender on frozen-thawed bull semen and *in vitro* fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 68(1), 53–61.
- Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734. <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pieper, L., Meschede, T., Jung, M., Janowitz, U., & Schulze, M. (2023). Influence of equilibration time and bull-specific extender for cryopreservation on semen quality and fertility in german holstein friesland bulls: A controlled field trial. *Animals*, 13(14), Article 2285. <https://doi.org/10.3390/ani13142285>
- Pintus, E., & Ros-Santaella, J. L. (2021). Impact of oxidative stress on male reproduction in domestic and wild animals. *Antioxidants*, 10(7), Article 1154 <https://doi.org/10.3390/antiox10071154>
- Qamar, A. Y., Naveed, M. I., Raza, S., Fang, X., Roy, P. K., Bang, S., Tanga, B. M., Saadeldin, I. M., Lee, S., & Cho, J. (2023). Role of antioxidants in fertility preservation of sperm - A narrative review. *Animal Bioscience*, 36(3), 385–403. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0325>
- Raad, G., Lteif, L., Lahoud, R., Azoury, J., Azoury, J., Tanios, J., Hazzouri, M., & Azoury, J. (2018). Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology*, 6(6), 836–845. <https://doi.org/10.1111/andr.12531>
- Raheja, N., Grewal, S., Sharma, N., Kumar, N., & Choudhary, S. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 239–245. <https://www.entomoljournal.com/archives/?year=2018&vol=6&issue=3&ArticleId=3575>
- Roca, J., Martinez-Alborcia, M. J., Gil, M. A., Parrilla, I., & Martinez, E. A. (2013). Dead spermatozoa in raw semen samples impair *in vitro* fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 100(3), 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.020>

- Ruan, Q., Yang, S., Hua, S., Zhang, W., Li, D., Yang, Y., Wang, X., Wang, Q., & Meng, Z. (2024). Supplementation of extender with melatonin improves the motility, mitochondrial membrane potential, and fertilization ability of cryopreserved brown-marbled grouper sperm. *Animals*, *14*(7), Article 995. <https://doi.org/10.3390/ani14070995>
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Reza Talebi, A. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, *14*(4), 231–240.
- Saili, T., Nafiu, L. O., Pagala, M. A., Bain, A., Aku, A. S., Rahadi, S., Rusdin, M., & Lopulalan, F. (2023). Sperm quality of Bali bull following sexing and freezing using different cryoprotectants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1241*(1), Article 012137. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1241/1/012137>
- Sakatani, M. (2022). [The role of reproductive biology in SDGs] Global warming and cattle reproduction: Will increase in cattle numbers progress to global warming? *Journal of Reproduction and Development*, *68*(2), 90–95. <https://sdgs.un.org/goals>
- Sandfoss, M. R., Cantrell, J., Roberts, B. M., & Reichling, S. (2022). Cryopreservation of sperm from an endangered snake with tests of post-thaw incubation in caffeine. *Animals*, *12*(14), Article 1824. <https://doi.org/10.3390/ani12141824>
- Saranholi, D. A. C., Paula, R. R. de, Pytilak, E., Afonso, F., Canela, L. F., Almeida, A. B. M. de, Hidalgo, M. M. T., Martins, M. I. M., Blaschi, W., & Barreiros, T. R. R. (2021). Comparison of seminal characteristics of Aberdeen Angus, Holstein and Nelore bulls before and after cryopreservation. *Research, Society and Development*, *10*(16), Article e408101623382. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23382>
- Sathe, S. (2021). Cryopreservation of semen. In M. Richard, D. V. M. Hopper, & A. C. T. Diplomat (Eds.), *Bovine reproduction* (pp. 986–999). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch78>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, *24*(10), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schulze, M., Grobbel, M., Riesenbeck, A., Brüning, S., Schaefer, J., Jung, M., & Grossfeld, R. (2017). Dose rates of antimicrobial substances in boar semen preservation—time to establish new protocols. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(3), 397–402. <https://doi.org/10.1111/rda.12921>
- Seshoka, M. M., Mphaphathi, M. L., & Nedambale, T. L. (2016). Comparison of four different permitting and combination of two best cryoprotectants on freezing Nguni sperm evaluated with the aid of computer aided sperm analysis. *Cryobiology*, *72*(3), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.04.001>
- 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>
- Sharafi, M., Blondin, P., Vincent, P., Anzar, M., & Benson, J. D. (2022). Hydroxytyrosol and resveratrol improves kinetic and flow cytometric parameters of cryopreserved bull semen with low cryotolerance. *Animal Reproduction Science*, *245*, Article 107065. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107065>
- Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of semen in domestic animals: A review of current challenges, applications, and prospective strategies. *Animals*, *12*(23), Article 107065. <https://doi.org/10.3390/ani12233271>
- Sieme, H., & Oldenhof, H. (2015). Sperm cleanup and centrifugation processing for cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*, *1257*, 343–352. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_16

- Silpa, M. V., König, S., Sejian, V., Malik, P. K., Nair, M. R. R., Fonseca, V. F. C., Maia, A. S. C., & Bhatta, R. (2021). Climate-resilient dairy cattle production: Applications of genomic tools and statistical models. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 625189. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.625189>
- Silvestre, M. A., Yániz, J. L., Peña, F. J., Santolaria, P., & Castelló-Ruiz, M. (2021). Role of antioxidants in cooled liquid storage of mammal spermatozoa. *Antioxidants*, 10(7), Article 1096. <https://doi.org/10.3390/antiox10071096>
- Simonik, O., Bubenickova, F., Tumova, L., Frolikova, M., Sur, V. P., Beran, J., Havlikova, K., Hackerova, L., Spevakova, D., Komrskova, K., & Postlerova, P. (2022). Boar sperm cryopreservation improvement using semen extender modification by dextran and pentaisomaltose. *Animals*, 12(7), Article 868. <https://doi.org/10.3390/ani12070868>
- Slanina, T., Petrovičová, L., Miškeje, M., Kňížat, L., Mirda, J., Lukáč, N., Trandžík, J., Petrovičová, I., & Massányi, P. (2015). The effect of diluent, temperature and age on turkey spermatozoa motility *in vitro*. *Journal of Applied Animal Research*, 43(2), 131–136. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.928627>
- Stuart, C. C., Vaughan, J. L., Kershaw, C. M., de Graaf, S. P., & Bathgate, R. (2019). Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9, Article 12826. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49203-z>
- Sztein, J. M., Takeo, T., & Nakagata, N. (2018). History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 82, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.008>
- Thema, M. A., Mphaphathi, M. L., Ledwaba, M. R., & Nedambale, T. L. (2023). Sperm cryopreservation in Windsnyer boars; principles, technique, and updated outcomes. *Animal Reproduction*, 20(3), Article e20220100. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0100>
- Tvrďá, E., Massanyi, P., & Lukáč, N. (2018). Physiological and Pathological Roles of Free Radicals in Male Reproduction. In R. Meccariello, & R. Chianese (Eds.), *Spermatozoa- Facts and Perspectives* (pp. 117-157). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70793>
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, Article 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Vanvanhossou, S. F. U., Dossa, L. H., & König, S. (2021). Sustainable management of animal genetic resources to improve low-input livestock production: Insights into local beninese cattle populations. *Sustainability*, 13(17), Article 9874. <https://doi.org/10.3390/su13179874>
- Vázquez Gil, Á., & Guevara Viera, G. (2021). La genética molecular en la conservación de los recursos zoogenéticos. *Revista de Producción Animal*, 33(2), 83-101.
- Vilela, C. G., Marquez, J. M., Graham, J. K., & Barfield, J. P. (2017). Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. *Theriogenology*, 89, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.044>
- Villaverde-Morcillo, S., Soler, A. J., Estes, M. C., Castaño, C., Miñano-Berna, A., Gonzalez, F., & Santiago-Moreno, J. (2017). Immature and mature sperm morphometry in fresh and frozen-thawed falcon ejaculates. *Theriogenology*, 98, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.051>
- Viquez, L., Barquero, V., & Valverde, A. (2021). Optimal conditions for the kinematic analysis in fresh semen of Brahman bulls with a CASA-Mot system. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 920–938. <https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.42768>

- Viquez, L., Sevilla, F., Araya-Zúñiga, I., Soler, C., Barquero, V., Roldan, E. R. S., & Valverde, A. (2023). Morphometric assessment of cryopreserved livestock bull spermatozoa in the tropics. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(10), 1439–1447. <https://doi.org/10.1111/rda.14459>
- Viudes de Castro, M. P., Talaván, A. G., & Vicente, J. S. (2021). Evaluation of dextran for rabbit sperm cryopreservation: Effect on frozen–thawed rabbit sperm quality variables and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 226, Article 106714. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106714>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246, Article 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Yang, S. X., Adams, G. P., Palomino, J. M., Huanca, W. F., Lessard, C., Rajapaksha, K., & Anzar, M. (2020). Cryopreservation of bison semen without exogenous protein in extender and its fertility potential in vitro and in vivo following fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, 152, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.018>
- Zeitoun, M. M., & Al-Damegh, M. A. (2015). Effect of Nonenzymatic Antioxidants on Sperm Motility and Survival Relative to Free Radicals and Antioxidant Enzymes of Chilled-Stored Ram Semen. *Open Journal of Animal Sciences*, 5(1), 50–58. <https://doi.org/10.4236/ojas.2015.51007>

Manuscrito aceptado