Agronomía Mesoamericana

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Revisión bibliográfica
Volumen 36: Artículo 61375, 2025
e-ISSN 2215-3608, https://doi.org/10.15517/am.2025.61375
https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/index

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

Cryopreservation of Livestock Species Germplasm: A Step Towards Sustainability

Ignacio Araya-Zúñiga[1,3], Francisco Sevilla[2,3], José A. González[4], Kenneth Matamoros[3], Anthony Valverde[3]

* 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. 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 Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, Alajuela, Costa Rica. igaraya@estudiantec.cr (https://orcid.org/0000-0002-4292-2287).

[2] Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional y Universidad Estatal a Distancia, 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] Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Maestría en Gerencia Agroempresarial. 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 su posible contribución al desarrollo sostenible. **Desarrollo.** Se revisaron artículos científicos publicados entre los años 2000 y 2024 en las bases de datos Web of Science, Scopus y Science Direct. La congelación espermática se puede considerar una forma de optimizar la reproducción de los animales. Sin embargo, durante el proceso, se puede estimular la formación de especies reactivas de oxígeno, 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 se asocia con la inseminación artificial, 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 contribuido al aumento de la productividad y la eficiencia de los sistemas ganaderos, así como a la posibilidad de conservación de las especies, los cuales son factores claves para alcanzar la sostenibilidad.

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

© 2025 Agronomía Mesoamericana es desarrollada en la Universidad de Costa Rica bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional. Para más información escriba a pccmca@ucr.ac.cr o pccmca@gmail.com

Abstract

Introduction. Climate change has necessitated modifications to production methods in livestock systems. **Objective.** To review the state of the art on the sperm cryopreservation from livestock species and its potential contribution to sustainable development. **Development.** Scientific articles published between 2000 and 2024 were reviewed from the Web of Science, Scopus, and ScienceDirect databases. Sperm freezing can be considered a method to optimize animal reproduction. However, during the process, reactive oxygen species formation can be stimulated, promoting membrane lipid peroxidation, which may cause structural and molecular damage compromising sperm functionality and male gamete fertilizing capacity. The success of sperm cryopreservation in livestock species can be improved through the inclusion of extrinsic factors such as antioxidant addition, centrifugation, or freezing method selection. This reproductive biotechnology is associated with artificial insemination, and the combination of these techniques has enabled optimization of livestock system profitability through continuous genetic improvement. **Conclusions.** The optimization of germplasm cryopreservation in species of zootechnical interest has contributed to increased productivity and efficiency in livestock systems, as well as to species conservation possibilities, which are key factors to achieve sustainability.

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

Introducción

La demanda creciente de alimentos junto con la presión constante generada por el cambio climático sobre los sistemas productivos evidencia la necesidad de transformar la forma de producir (Vanvanhossou et al., 2021). La eficiencia reproductiva se considera un factor importante para mejorar 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 que 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). Su aplicación en conjunto con otras biotecnologías reproductivas, como 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 este 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 visto 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 la década de 1960 (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, como las abejas (Gül et al., 2017; Gulov et al., 2023), los dromedarios (Malo et al., 2020), los camélidos sudamericanos (Fumuso et al., 2021; Stuart et al., 2019), los bisontes (Vilela et al., 2017) y los osos pardos (Gomes-Alves et al., 2014), e incluso en especies amenazadas en riesgo de extinción, como el elefante asiático (Arnold et al., 2017), el tigre siberiano (Ibrahim et al., 2022) y 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 ocasiona 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 ello, se han estudiado mecanismos para optimizar el proceso de congelación que reduzcan el estrés físico y químico en el gameto masculino durante el proceso de conservación.

El uso de sustancias crioprotectoras (Fumuso et al., 2021; Seshoka et al., 2016), antibióticos que limiten el crecimiento de microorganismos (Schulze et al., 2017), polisacáridos (Chung et al., 2019; Viudes de Castro et al., 2021) y antioxidantes que limitan el efecto del estrés oxidativo (Branco et al., 2010; ChaithraShree et al., 2020; Makris et al., 2023; Silvestre et al., 2021), contribuye a mejorar la calidad de la criopreservación. 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 espermas 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. Tales investigaciones favorecen la selección y mejora en los procesos de conservación.

Una de las principales limitaciones del proceso de criopreservación es la falta de estandarización metodológica desde la colecta del semen hasta el descongelado de la pajilla en los diferentes centros de investigación. Esto incide en la repetibilidad de la técnica y provoca la disminución en la eficiencia de los procesos de congelación espermática (Yánez-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 al desarrollo sostenible.

Metabolismo celular

Durante el metabolismo celular, el espermatozoide requiere producir energía para completar sus funciones y, durante el trasporte de electrones en la mitocondria, se generan especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) como el superóxido, el 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 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 en el citoplasma producto de la división celular (Sabeti et al., 2016). No obstante, a nivel celular no solo se producen radicales asociados al 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, las proteínas y los ácidos nucleicos (Ford, 2004).

La membrana de la célula espermática es rica en ácidos grasos poliinsaturados, 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, tales como 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 desempeñan una 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, tiorredoxina reductasa, peroxirredoxinas y hemo oxigenasa (Córdova-Izquierdo et al., 2010). Por su parte, los antioxidantes no enzimáticos son moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas que se encuentran en la estructura celular, como el glutatión, las vitaminas D, E y 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. Dicho mecanismo es conocido como "criocapacitación", 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 una forma de optimizar el uso de los animales (Khan et al., 2021), debido a que posibilita mantener material genético de alto valor por largos periodos (Simonik et al., 2022) y favorece la distribución del material genético y el resguardo de la biodiversidad (Kalwar et al., 2022). Sin embargo, se estimulan la formación de radicales libres que promueven la peroxidación lipídica de la membrana, lo que provoca daños a nivel estructural y molecular, y comprometen la capacidad funcional y fecundante del gameto masculino (El-Seadawy et al., 2022; Gürler et al., 2016; Marques et al., 2023; Ozimic et al., 2023).

La criopreservación también estimula la cantidad de radicales libres en el semen y ocasiona que las células espermáticas sufran afectaciones, lo cual compromete las características que definen la calidad del esperma; por ejemplo, la integridad de la membrana, la movilidad o el nivel de fragmentación del ADN nuclear espermático al momento de 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 de 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 su capacidad para soportar 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 la forma de las células espermáticas a la descongelación (Víquez et al., 2023). En consecuencia, se ha identificado que el tamaño y la forma de la célula están relacionados con la capacidad de estas para 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 seleccionar los machos con mayor potencial (Esteso et al., 2006). En años recientes, se ha encontrado que variables como la hiperactivación de 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 burros, en los cuales 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 posdescongelación, como la movilidad espermática, se asocian a la superóxido dismutasa, la capacidad equivalente al trolox (análogo de la vitamina E) y la reducción férrica del plasma, mientras que la viabilidad se relaciona con los niveles de glutatión peroxidasa, paraoxonasa 1, trolox y superóxido dismutasa (Li, Barranco et al., 2018).

Antes y durante el proceso de la criopreservación y dilución del semen, se deben utilizar sustancias capaces de aportar un medio nutritivo y mantener las características normales del eyaculado al momento de 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 el diluyente y los agentes crioprotectores son factores relevantes que pueden afectar la distribución de subpoblaciones espermáticas, al caracterizar estas mediante parámetros morfométricos de tamaño y forma de la cabeza (Víquez et al., 2023), así como de patrones cinemáticos (Víquez 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 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 provocar una considerable afectación sobre la capacidad de fertilizar de los espermatozoides, a causa de la interacción de estos con compuestos producidos por las células muertas que fomentan los ROS y afectan la viabilidad, la 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 incrementar 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 seleccionar los espermatozoides más aptos para fertilizar el ovocito. A través de este proceso, se eliminan los espermatozoides no viables, los fragmentos celulares y el plasma seminal, que resultan en una fuente endógena de ROS extracelular (Sieme & Oldenhof, 2015), e incluso 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 & Rodriguez-Martinez, 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 esperma posterior 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; Gloria et al., 2016; Hoogewijs et al., 2011). No obstante, 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 incremento significativo en la movilidad progresiva que exhiben las células al ser analizadas; sin embargo, podría afectar la concentración de espermatozoides (Androni et al., 2021). En porcinos, el estudio de la centrifugación de las dosis seminales posterior a su descongelación ha demostrado un efecto negativo en la movilidad total y progresiva, con valores de disminución entre 5 y 10 % (Almubarak et al., 2021). Otros trabajos han evidenciado 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), verracos (He et al., 2020; Kaeoket & Chanapiwat, 2023), carneros (Akhter et al., 2023; Carriço et al., 2023), humanos (Atig et al., 2017; Branco et al., 2010), burros (Catalán et al., 2022) y toros (ChaithraShree et al., 2020; Sharafi, Blondin et al., 2022). Los antioxidantes disminuyen el efecto negativo de los ROS durante la criopreservación espermática y permiten 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 poscongelación (Carriço et al., 2023). No obstante, dentro de sus conclusiones los autores señalan que es necesario optimizar 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 e integridad tanto de la membrana plasmática como del acrosoma posterior 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 la cuantificación de 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 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. No obstante, 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 criotolerancia ya conocida. Al suplementar las muestras seminales previo a la congelación con 0,1 nM del RSV, mejoró de manera 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 bovinos 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 esperma de los animales se considera una técnica de reproducción asistida. Sin embargo, con frecuencia se asocia a 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 que mejora la productividad (Kalwar et al., 2022; Ugur et al., 2019) mediante la distribución global de material genético de élite 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). No obstante, es necesaria la estandarización de los protocolos de congelación para 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 y al cambio climático, e incluso se puede conservar 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, es posible 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 la diversidad genética de las especies, cuyo estatus global se puede considerar en peligro (Sandfoss et al., 2022).

A nivel mundial, existe preocupación por la pérdida de recursos zoogenéticos considerados como criollos, los cuales han sobrevivido durante muchos años a procesos de selección. Estos recursos se consideran fundamentales al ser fuente de alimento para poblaciones humanas de zonas rurales y un medio de apoyo para las labores agrícolas, debido a su elevado grado de adaptación a las condiciones locales, producto de años de selección (Vanvanhossou et al., 2021; Vázquez Gil & Guevara Viera, 2021). Además, poseen un valor cultural e histórico para diversos países y regiones (Da Silva, 2014).

En América Latina, la mayoría de los recursos zoogenéticos bovinos autóctonos se han perdido por la poca relevancia que se le ha dado a su conservación, consecuencia de 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 mayoría de los casos, son reemplazadas por materiales genéticos del exterior, categorizados como de "élite". Sin embargo, a nivel práctico, estas razas importadas bajo las condiciones actuales de cambio climático y las condiciones ambientales imperantes en el trópico no son eficientes en términos productivos y ambientales. 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 alcanzado 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 Colombia, se han efectuado 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 en la conservación de espermatozoides de toros de la raza de ganado Bali (Saili et al., 2023).

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 Sudáfrica, se han logrado notables avances en la conservación del material genético de la raza de ganado indígena Nguni, enfocados en la estandarización de los protocolos por medio del 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 zoogenético de cerdos nativos del sur de África ha sido plasmado en trabajos pioneros enfocados en la estandarización de los protocolos de congelación en la raza de cerdo Windsnyer (Thema et al., 2023). Aunque el objetivo no era la conservación de la raza, estos estudios pueden 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 la viabilidad, lo que limita la fertilidad del gameto masculino. La utilización de diluyentes específicos, la eliminación de células no viables mediante centrifugación y la adición de sustancias antioxidantes contribuyen a mejorar la calidad del semen posterior a la descongelación.

Es necesario enfocar la investigación en la estandarización de protocolos de congelación bajo condiciones extrínsecas del individuo que son adversas y están relacionadas con factores nutricionales y ambientales, como una posible alternativa para aumentar la productividad de los sistemas ganaderos en el contexto del cambio climático. Además, estos protocolos deben constituir una herramienta para preservar la biodiversidad zoogenética y 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 también agradece al programa de la 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 conflictos de interés.

Referencias

Agarwal, A., Varghese, A. C., & Sharma, R. K. (2009). Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. In O.-K. Park-Sarge, & T. E. 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

Carriço, 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., Yánez-Ortiz, I., Torres-Garrido, M., Ribas-Maynou, J., Llavanera, 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 322. https://doi.org/10.3390/antiox13030322

Catalán, J., Yánez-Ortiz, I., Tvarijonaviciute, 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

ChaithraShree, 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

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

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. *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), Article 36. 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 da Silva, 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, J., Barranco, I., Tvarijonaviciute, A., Molina, M. F., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, 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

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

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

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

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. R., Soler, A. J., & Garde, J. 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. A. (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. M., Sánchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaria, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2007). Crioconservación 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. *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 friesian 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., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *6*(3), 239–245. 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://doi.org/10.1262/jrd.2021-149

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., De Paula, R. R., Pytilak, E., Afonso, F., Canela, L. F., De Almeida, A. B. M., 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 3271. https://doi.org/10.3390/ani12233271

Sieme, H., & Oldenhof, H. (2015). Sperm cleanup and centrifugation processing for cryopreservation. In W. Wolkers & H. Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (Vol. 1257, pp. 343-352). Springer. 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

Tvrdá, 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., Esteso, 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

Víquez, 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

Víquez, 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

Yánez-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