

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**COMPARACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE CONGELAMIENTO DE SEMEN Y SU
IMPACTO EN LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA EN TOROS
DE LA RAZA BRAHMAN**

POR:

YOSSLIN ESTEPHANY EUCEDA CHAVER

INFORME FINAL DE TESIS



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

NOVIEMBRE, 2025

**COMPARACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE CONGELAMIENTO DE SEMEN
Y SU IMPACTO EN LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA
EN TOROS DE LA RAZA BRAHMAN**

POR:

YOSSLIN ESTEPHANY EUCEDA CHAVER

PhD KELVIN ESPINOZA BLANDON

ASESOR PRINCIPAL

INFORME FINAL DE TESIS

**PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

CATACAMAS

OLANCHO

NOVIEMBRE, 2025

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi refugio constante, mi guía y la luz que nunca dejó de sostenerme aun cuando el camino se volvió difícil. Cada paso en esta meta lleva su gracia.

A mi mamá, que aunque ya no está físicamente conmigo, sigue siendo mi fuerza más silenciosa y mi motivo más grande. Su amor, sus enseñanzas y su recuerdo viven en cada triunfo que hoy abrazo. Este logro también es suyo.

A mi papá, que ha caminado a mi lado con sacrificio, paciencia y un amor inquebrantable. Su esfuerzo y su dedicación han sido el pilar que me ha permitido avanzar y creer en mí misma. Gracias por nunca soltarme la mano.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por concederme la fortaleza, la sabiduría y la serenidad necesarias para perseverar en cada etapa de este proceso. Su guía fue mi compañía constante.

A mi mamá, cuya presencia sigue viva en mi corazón. Su amor, sus palabras y su ejemplo continúan siendo mi inspiración más grande. Este logro lleva su nombre.

A mi papá, por su entrega incansable, por cada sacrificio realizado y por caminar conmigo con paciencia y fe. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudé.

A mis hermanos, por su apoyo, su cariño y por recordarme que nunca camino sola. Su compañía ha sido un sostén invaluable.

Al PhD Kelvin Espinoza, mi asesor principal, por su orientación, su compromiso y su disposición para acompañarme en este proyecto con profesionalismo y paciencia.

A mi compañero de Servicio Social, Carlos Cuellar, por acompañarme incondicionalmente en cada paso del proceso de este estudio.

Y finalmente, a mí misma, por no rendirme, por mantenerme firme aun cuando el cansancio y la incertidumbre intentaron detenerme. Hoy reconozco mi esfuerzo, mi valentía y mi dedicación.

INDICE

RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
III. REVISIÓN LITERARIA	3
3.1 Morfología y estructura del espermatozoide	3
3.1.1 Cabeza, pieza intermedia y cola	3
3.1.2 Organización de la membrana plasmática.	4
3.2 Función de la membrana espermática	4
3.3 Criobiología del semen bovino.....	5
3.4 Protocolos de congelamiento.....	6
3.4.1 Método tradicional.....	6
3.4.2 Método alternativo con Ice cube	7
3.5 Evaluación de la integridad de la membrana espermática.....	7
3.6 Pruebas diagnósticas aplicadas	8
3.6.1 Tinción eosina-nigrosina	8
3.6.2 Tinción Rosa de bengala.....	8
3.6.3 Prueba hiposmótica (HOST)	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 Área de realización	10
4.1.1 Ubicación geográfica.....	10
4.2 Duración de la Investigación	10
4.3 Tipo de investigación.....	11
4.4 Población de estudio	11

4.4.1	Factores de inclusión	11
4.4.2	Factores de exclusión.....	11
4.5	Materiales y equipo	12
4.6	Metodología.....	13
4.6.1	Obtención de muestra de semen	13
4.6.2	Examen andrológico básico.....	13
4.6.3	Examen clínico general	13
4.6.4	Examen clínico de los órganos reproductivos	14
4.6.5	Análisis de una muestra de semen.....	14
4.6.6	Preparación de laminas.....	15
4.6.7	Prueba colorimétrica.....	15
4.6.8	Prueba de osmolaridad.....	16
4.6.9	Proceso de congelamiento	16
4.6.10	Interpretación de resultados.....	17
V.	RESULTADOS	18
5.1	Eosina- nigrosina.....	18
5.2	Test Hiposmótico.....	23
VI.	DISCUSIÓN.....	28
VII.	CONCLUSIONES.....	31
VIII.	RECOMENDACIONES	32
IX.	BIBLIOGRAFÍA	33
X.	ANEXOS	38

TABLA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 1 (Capitán).....	18
Gráfico 2: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 2 (Peanut).....	19
Gráfico 3: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 3 (Pablo).....	20
Gráfico 4: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 4 (Pompeye).....	21
Gráfico 5: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 5 (Duque).....	22
Gráfico 6: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test Hiposmótico en toro 1 (Capitán).....	23
Gráfico 7: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test hiposmótico en toro 2 (Peanut).....	24
Gráfico 8: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test Hiposmótico en toro 3 (Pablo).....	25

Gráfico 9: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test hiposmótico en toro 4 (Pompeye).....	26
Gráfico 10: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test hiposmótico en toro 5 (Duque).....	27

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1: Evaluación complementaria de integridad de membrana.	38
Anexo 2: Espermatozoides evaluados mediante la tinción eosina–nigrosina.	38
Anexo 3: Identificación de integridad de membrana mediante prueba hiposmótica (HOST).	39
Anexo 4: Preparación de muestras y láminas para evaluación de integridad espermática.	39
Anexo 5: Registro fotográfico de los toros utilizados en el estudio durante el proceso de colecta.	40
Anexo 6: Registro fotográfico de los toros utilizados en el estudio durante el proceso de colecta.	40
Anexo 7: proceso de evaluación seminal realizado en campo y laboratorio.	41
Anexo 8: Equipos empleados para la implementación de los dos protocolos de congelamiento.	41
Anexo 9: proceso de congelamiento controlado de pajillas seminales utilizando el método de IceCube.	42

RESUMEN

Esta investigación comparó dos protocolos de congelamiento de semen bovino (Isopor vs IceCube) con el objetivo de evaluar su impacto en la integridad de la membrana espermática en toros Brahman. Durante seis meses se realizaron colectas, exámenes andrológicos y análisis seminal inicial, seguido de la preparación de láminas y la aplicación de las pruebas eosina-nigrosina y test hiposmótico.

Los resultados evidenciaron que ambos protocolos de congelamiento generaron un impacto claro sobre la integridad de la membrana espermática, reflejado en un aumento de células teñidas y alteraciones osmóticas. El método Isopor provocó el deterioro más evidente, mientras que IceCube mostró efectos menos severos y una mayor estabilidad en términos generales. Además, las comparaciones entre la muestra nativa y los dos métodos de congelamiento arrojaron diferencias significativas ($p < 0.0001$), lo que confirma el efecto marcado del proceso de criopreservación sobre la membrana espermática.

En conjunto, el estudio confirma que el proceso de congelamiento afecta la calidad de la membrana espermática y que los sistemas con curvas térmicas controladas, como IceCube, ofrecen una mejor protección durante la criopreservación.

Palabras clave: criopreservación, semen bovino, integridad de membrana, eosina–nigrosina, test hiposmótico, Brahman, IceCube

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es fundamental en ganadería para conservar genética e impulsar. Su éxito depende de mantener la integridad de la membrana espermática, esencial para la fertilidad. No obstante, el proceso de congelamiento y descongelamiento puede dañarla. Esto compromete la viabilidad y funcionalidad del espermatozoide. (Khalil et al., 2018). Esta es una técnica reproductiva clave en la ganadería moderna, pese a los avances recientes en criobiología espermática, aún existe aplicación limitada y su eficacia para proteger la viabilidad y funcionalidad espermática sigue siendo moderada (Grötter et al., 2019).

Diversos métodos de congelamiento se han evaluado con el objetivo de reducir este daño (Algieri et al., 2023). Un estudio comparó la influencia de la temperatura de descongelamiento sobre la motilidad y la integridad de las membranas espermáticas en semen bovino congelado, concluyendo que el manejo térmico adecuado es determinante para preservar estas estructuras (Ugur et al., 2019).

Por lo cual este siguiente trabajo tuvo como objetivo la comparación de dos protocolos de congelamiento de semen y su impacto en la integridad de la membrana espermática en toros de la raza brahman. La evaluación se realizó mediante pruebas colorimétricas (eosina-nigrosina) y osmóticas (HOST), con el fin de identificar la estrategia que mejor preserve la funcionalidad espermática para mejorar los resultados reproductivos en esta importante raza bovina.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar dos protocolos de congelamiento de semen y su impacto en la integridad de la membrana espermática en toros de la raza Brahman con la utilización de pruebas colorimétricas y osmótica.

2.2 Objetivos específicos

Calificar la integridad de la membrana espermática utilizando la prueba colorimétrica eosina-nigrosina.

Determinar la respuesta osmótica de los espermatozoides mediante prueba hiposmótica.

III. REVISIÓN LITERARIA

3.1 Morfología y estructura del espermatozoide

La morfología y estructura del espermatozoide bovino están relacionadas con su función reproductiva. Tiene una forma compuesta por cabeza, pieza intermedia y cola, cumpliendo un papel importante que es la protección del material genético y asegurar su movilidad.

3.1.1 Cabeza, pieza intermedia y cola

La cabeza del espermatozoide presenta una longitud de aproximadamente 10 micras y está recubierta por una doble membrana. Cerca de dos tercios de su superficie están ocupados por el acrosoma, la región terminal se conoce como segmento ecuatorial o cresta apical. El flagelo se origina de una estructura denominada capitulum, donde inicia el axonema y la pieza intermedia, caracterizada por una hélice doble de mitocondrias dispuestas alrededor del eje central.

El cuello, que conecta la cabeza con la pieza intermedia, tiene en su porción anterior al centriolo proximal. Este presenta una organización en forma de rueda dentada compuesta por nueve estructuras tubulares, cada una formada por tres túbulos independientes. Se considera que el centriolo actúa como un centro regulador de la motilidad espermática.

La cola se divide en tres regiones funcionales: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza intermedia está envuelta por la vaina mitocondrial, que termina bruscamente en la transición hacia la pieza principal, donde esta es reemplazada por una vaina fibrosa delgada que rodea las fibras contráctiles internas. Finalmente, la pieza terminal se distingue por la ausencia de dicha vaina fibrosa, y su estructura está compuesta por un conjunto de fibras axiales con una disposición clásica: un anillo periférico externo, otro interno con nueve pares de microtúbulos, y un par central (Javier López, n.d.).

3.1.2 Organización de la membrana plasmática.

La membrana plasmática envuelve completamente al espermatozoide, y desde la pieza principal de la cola hasta su extremo, se observa una estructura de soporte con forma de costillas compuesta por un material de naturaleza fibrosa. En la porción terminal del espermatozoide, únicamente persisten los filamentos dobles, ya que los más gruesos culminan antes de esa región (Javier López, n.d.) .

3.2 Función de la membrana espermática

La membrana espermática cumple un papel esencial en la funcionalidad del espermatozoide, y su composición lipídica y proteica es necesaria para la viabilidad espermática y la fertilización.

Composición lipídica, proteica y su función en la fertilización y protección celular

En una investigación se evidenció que las proteínas del plasma seminal, particularmente las BSP (Binder of Sperma Proteins), desempeñan un papel en la regulación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática espermática. Estas proteínas interactúan con moléculas presentes en el tracto reproductor femenino, como la heparina y las lipoproteínas de alta densidad (HDL), la presencia

de estas proteínas es indispensable para que la acción de las BSP se lleve a cabo de manera efectiva.

A nivel fisiológico, las BSP inducen la salida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática, un momento importante en el proceso de capacitación. Sin embargo, este efecto no solo se activa con la presencia de BSP, sino que también necesita de un entorno adecuado del tracto genital femenino, gracias a la acción de los glucosaminoglicanos (GAGs) y HDL. Esta regulación permite que los espermatozoides permanezcan íntegros y no capacitados hasta llegar al sitio y momento adecuado para la fertilización (Manjunath & Thérien, 2002).

3.3 Criobiología del semen bovino

Durante la criopreservación, el daño celular a los espermatozoides al ser sometidos a un rápido congelamiento ha sido atribuido a la formación de hielo intracelular. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia concluyente de la existencia de estos cristales dentro del espermatozoide. Este fenómeno se explica por dos mecanismos principales. En primer lugar, el alto contenido proteico intracelular y la reducción osmótica provocada por la formación de hielo extracelular favorecen un proceso de vitrificación intracelular en lugar de cristalización.

En segundo lugar, durante el enfriamiento rápido, la formación de cristales en el medio extracelular está limitada por difusión, lo que provoca una menor cantidad de hielo de la que se esperaría en condiciones de equilibrio. Como resultado, al descongelar, los espermatozoides se da un choque osmótico a bajas temperaturas, lo que desencadena alteraciones estructurales especialmente a nivel de la membrana plasmática (John Morris et al., 2012).

3.4 Protocolos de congelamiento

Congelar semen es una técnica muy útil en la reproducción animal, ya que permite guardarlo por mucho tiempo sin que pierda su capacidad de fecundar. Para lograr buenos resultados, se siguen ciertos pasos o protocolos que ayudan a proteger a los espermatozoides durante el proceso. Existen métodos más sencillos, como el uso de cajas de isopor, y otros más modernos y automáticos, como el Ice Cube. Cada uno tiene sus ventajas, pero todos buscan lo mismo: mantener vivos y sanos a los espermatozoides para usarlos cuando se necesiten.

3.4.1 Método tradicional

El método tradicional de congelación de semen bovino mediante la exposición controlada a vapores de nitrógeno líquido ha demostrado ser una técnica eficaz y ampliamente utilizada en la reproducción animal. Este sistema permite regular la velocidad de enfriamiento en función de la distancia entre las pajillas y la superficie del nitrógeno, lo cual es fundamental para preservar la integridad estructural y funcional de los espermatozoides.

Se ha establecido que suspender las pajillas entre 4 y 6 cm por encima del nitrógeno líquido genera una curva de enfriamiento parabólica, considerada ideal para optimizar la crioprotección. En particular, esta altura ha resultado ser adecuada para pajillas de 0,5 mL, mientras que una distancia de 4 cm es recomendada para pajillas de 0,25 mL, durante un periodo de exposición de entre 12 y 15 minutos. Estas condiciones permiten una transición térmica uniforme, reduciendo el riesgo de lesiones osmóticas o mecánicas asociadas a cambios térmicos abruptos, favoreciendo así una mayor tasa de supervivencia espermática post-descongelación (Asociación Angus Mexicana, 2021).

3.4.2 Método alternativo con Ice cube

En estudios comparativos, este tipo de técnica logró disminuir la formación de radicales libres y, en consecuencia, redujo la lipoperoxidación, lo cual es fundamental para preservar la estabilidad de los componentes lipídicos de la membrana plasmática. Esta protección también se reflejó en una menor pérdida de colesterol y una reducción en la translocación de fosfatidilserina, procesos asociados con el inicio de la apoptosis espermática.

Además, el método automatizado permitió mantener una motilidad espermática más prolongada durante la incubación a 38 °C por 120 minutos. Aunque no se observó una mejora significativa en la activación de caspasas o en algunos estados funcionales de la membrana frente al método convencional, los beneficios relacionados con el estrés oxidativo y la estabilidad estructural hacen que el uso de sistemas automatizados como el *Ice Cube* sea una alternativa prometedora para optimizar la calidad espermática post-descongelación (Pezo et al., 2023).

3.5 Evaluación de la integridad de la membrana espermática

La evaluación de la integridad de la membrana espermática es fundamental para determinar la viabilidad funcional del espermatozoide y su capacidad fecundante. Por ello se han desarrollado diversas técnicas para diagnosticar su estado, especialmente tras procesos como la criopreservación.

3.6 Pruebas diagnósticas aplicadas

3.6.1 Tinción eosina-nigrosina

De acuerdo con una investigación la tinción eosina-nigrosina permite identificar con eficacia aquellos espermatozoides que conservan la integridad de su membrana plasmática, lo cual es esencial para evaluar su viabilidad. Aunque puede haber variaciones en el número de células clasificadas como viables según el momento del análisis tras la recolección del eyaculado, esta técnica demuestra una mayor capacidad para detectar daños en la membrana a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento in vitro (Wysokińska & Kondracki, 2014).

3.6.2 Tinción Rosa de bengala

Diversos protocolos han sido propuestos para optimizar la evaluación morfológica espermática, y actualmente se comparan diferentes técnicas de tinción en varias especies. En estudios realizados con pecaríes de collar, la rosa de bengala demostró ser significativamente más eficiente que otras coloraciones comunes como el azul de bromofenol o la eosina-nigrosina. Esta eficacia se traduce en una mayor claridad para identificar estructuras celulares, lo que resulta especialmente útil para evaluar la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides frescos (Lima et al., 2013).

Gracias a su alta afinidad por zonas dañadas, esta tinción permite una distinción más precisa entre células con membranas íntegras y aquellas comprometidas, consolidándose como una herramienta valiosa en estudios de calidad espermática.

3.6.3 Prueba hiposmótica (HOST)

La prueba hiposmótica (HOST) se ha consolidado como una herramienta fundamental para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides, especialmente tras procesos de congelación y descongelación. Esta técnica se basa en la capacidad de los espermatozoides viables de responder a un medio con baja osmolalidad, generando una curvatura o hinchamiento característico en su cola, lo que indica una membrana funcionalmente activa y semipermeable.

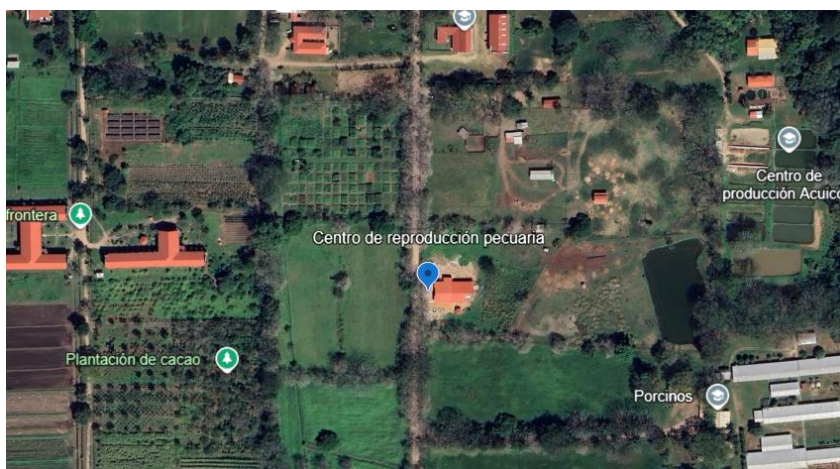
Su aplicación resulta especialmente valiosa en semen bovino criopreservado, ya que permite identificar aquellos espermatozoides que han conservado su funcionalidad estructural, condición indispensable para que puedan participar con éxito en la fecundación. Además, al no requerir equipamiento complejo, el HOST representa una herramienta accesible, eficaz y complementaria a otras pruebas de vitalidad, útil tanto en programas de reproducción asistida como en estudios de criobiología espermática (Yeoh et al., 2023).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de realización

4.1.1 Ubicación geográfica

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Reproducción Pecuaria de la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG), en convenio con la Universidad Nacional de Agricultura (UNAG). Ubicado en la ciudad de Catacamas, en el departamento de Olancho (14°49'31"N 85°50'31"W).



Fuente: Google Earth

4.2 Duración de la Investigación

La investigación se desarrolló en un plazo de 6 meses, a partir del mes de mayo hasta noviembre del año 2025.

4.3 Tipo de investigación

La presente investigación se basó en un enfoque cuantitativo transversal, con un diseño experimental del tipo comparativo, el cual se orienta en la evaluación del efecto del proceso de congelamiento sobre la integridad de la membrana espermática en toros de la raza Brahman.

4.4 Población de estudio

Para el estudio se seleccionaron 5 toros Brahman, con edades comprendidas entre 2 y 8 años, clínicamente sanos y con historial reproductivo favorable. La elección de la raza Brahman se fundamentó en su alta demanda en los sistemas de producción bovina en países tropicales, como es el caso de Honduras.

4.4.1 Factores de inclusión

Se incluyeron en el estudio toros de la raza Brahman considerados clínicamente sanos, con una edad reproductiva activa entre los 2 y 8 años y una producción seminal considerada normal en cuanto a volumen, concentración, motilidad y morfología. Los eyaculados fueron obtenidos mediante electroeyaculado. El semen no fue previamente congelado, ni manipulado mediante procesos de criopreservación.

4.4.2 Factores de exclusión

Se excluyeron del estudio aquellos toros que pertenecen a razas distintas a Brahman o cruces entre razas. También se excluyeron aquellos animales con un historial de enfermedades reproductivas, lesiones testiculares o cualquier alteración identificada

durante el examen andrológico básico. No se considerarán las muestras seminales que presenten signos de contaminación, como la presencia de pus, sangre u orina. Se eliminarán del análisis de muestras recolectadas en condiciones que presenten errores técnicos durante su manipulación, procesamiento o evaluación. No serán válidas aquellas muestras que hayan sido expuestas a temperaturas no controladas o que hayan sido congeladas sin respetar el protocolo establecido.

4.5 Materiales y equipo

Para la realización del estudio se utilizaron los siguientes materiales y equipos: electroeyaculador, guantes desechables estériles y de palpación, termómetro veterinario, estetoscopio, manga de contención, cinta métrica, ecógrafo portátil con transductor lineal, desinfectantes como clorhexidina y cuaderno o planilla para registro clínico. En el laboratorio se emplearon tubos colectores de semen estériles, gradilla para tubos, termómetro de laboratorio, papel indicador de pH, microscopio óptico con aumentos de 40X, 100X y 1000X.

También se necesitó de microscopio estereoscópico o lupa binocular, portaobjetos, cubreobjetos, cámara de Neubauer o fotómetro espermático, placa calentadora a 37 °C, suero fisiológico estéril, pipetas automáticas ajustables, puntas estériles, tinción eosina-nigrosina, rosa de bengala, solución hiposmótica (agua destilada), baño maría a 37 °C, toallas de papel, marcadores indelebles y alcohol al 70 %. Para el proceso de congelamiento se utilizó pajuelas de 0.25 mL o 0.5 mL, sellador térmico, gradilla para pajuelas, caja de espuma para congelamiento manual, base de soporte para paletas, nitrógeno líquido, termo contenedor y máquina Ice Cube.

4.6 Metodología

4.6.1 Obtención de muestra de semen

La muestra se obtuvo de toros raza Brahman, mediante el proceso de colección con electroeyaculador, este consiste en hacer limpieza del área del prepucio y lavado del pene con ayuda de solución salina temperada a 37 °C. Antes de introducción la sonda del electroeyaculador se debe hacer retirado de heces, para proseguir a hacer estímulo mediante el palpado rectal de las glándulas accesorias del aparato reproductor. Una vez hecho esto se procede a hacer estímulos con el electroeyaculador, para esto, para cada toro se usa una onda, la cual depende de la sensibilidad del toro.

Cuando se obtiene la muestra se procura proteger de la luz y evitar cambios de temperatura, por lo que se procura llevar en el menor tiempo posible al laboratorio.

4.6.2 Examen andrológico básico

El examen andrológico es una herramienta necesaria para evaluar la capacidad reproductiva de los toros. La aplicación de esto permite garantizar una selección más exacta de reproductores fértiles. A continuación, se presentará un protocolo recomendado por el PhD Neimar Corrêa Severo.

4.6.3 Examen clínico general

La revisión incluyó la revisión de los ojos y la visión, la boca, los dientes y el hocico. También se examinó la cabeza, el tórax y el pecho, así como el abdomen, el lomo y los ganglios linfáticos. Se tomó en cuenta también la evaluación del sistema locomotor, evaluando también piernas y cascos.

4.6.4 Examen clínico de los órganos reproductivos

Para esta etapa, primero, se realizó una inspección visual, que se basas en observar externamente los genitales, para detectar si existen alteraciones como asimetría inflamaciones, lesiones, entre otras. Luego se procedió a hacer una palpación de estructuras como testículos, epidídimos y cordones espermáticos. Posteriormente con ayuda de un ecógrafo se procedió a observar las estructuras antes mencionadas en busca de alteraciones como procesos inflamatorios, acumulación de líquido y otros hallazgos.

Durante este examen se tomó ciertos aspectos, comenzando por el desarrollo de los órganos en relación con su edad y el tamaño corporal del animal, presencia de las estructuras, dimensiones, consistencia, simetría y movilidad.

4.6.5 Análisis de una muestra de semen

Durante la evaluación andrológica se registraron el volumen del eyaculado en mililitros (mL), observándose directamente desde el tubo de colecta. Se tomó en cuenta valores normales entre 2 y 6 mL en toros jóvenes y hasta 25 mL en adultos. El color del eyaculado también se evaluó, considerado normal el tono blanquecino o nacarado, mientras que tonalidades como amarilla, rojiza, marrón, gris o verdosa indicaron posibles presencias de riboflavinas, sangre, contaminación o pus. Además, se analizó el aspecto visual: cremoso, lechoso, opalescente o acuoso, lo cual sugirió distintos rangos de concentración espermática.

El pH se midió con papel indicador, esperándose valores entre 6.4 y 7.8. También se evaluó la motilidad en masa (turbiamiento), observando ondas en forma de “Ω” bajo microscopio con aumento de 10X. Para la motilidad espermática, se usó una muestra

diluida en 1:29 con suero fisiológico a 37 °C, observándose bajo aumento de 10X, en el programa AndroVision, identificando motilidad, motilidad progresivo y concentración. El dato de concentración fue rectificado en fotómetro y cámara de Neubauer.

4.6.6 Preparación de laminas

Para el análisis de integridad de la membrana espermática se desarrollaron ciertas pruebas; por un lado, una prueba colorimétrica y por el otro una prueba funcional. Todas las preparaciones fueron hechas por cada colecta.

4.6.7 Prueba colorimétrica

Eosina-nigrosina

Para el procedimiento de tinción con eosina-nigrosina, se partió por calentar los portaobjetos a una temperatura de 37°C utilizando una placa calentadora. Posteriormente se hizo una dilución 4:1 de la tinción Eosina-Nigrosina con solución salina en un vial. En un vial aparte se agregaron 50 µL de semen diluido 1:2, y a esta mezcla se le agregaron otros 50 µL de solución salina. Una vez homogenizados se incorporaron 50 µL de la dilución antes hecha de Eosina-Nigrosina.

Una vez hecho el anterior proceso, se procedió a hacer el extendido, este se basó en usar el borde de otro portaobjeto sostenido en un ángulo de 30° a 40° tomando en cuenta 200 espermatozoides, formando lo que es conocido como frotis. Luego se volvió a colocar el portaobjeto en la placa calentadora durante algunos minutos, hasta que secó el frotis.

Con la lámina lista, se procedió a observar con Lupa con un lente de 40X. La interpretación de esta evaluación se basó en observar espermatozoides de color blanco, ya que los espermatozoides no se tiñeron, lo que significa que la membrana plasmática se encontraba íntegra. Sin embargo, aquellos con membrana dañada se observaron con una tonalidad rosada/morada, por presencia de eosina en el interior (Foster et al., 2011).

4.6.8 Prueba de osmolaridad

Test hiposmótico

La prueba se llevó a cabo con la exposición de una mezcla de 75 µL de semen y 475 µL de solución hiposmótica (agua bidestilada) en un baño María a 37° C durante 30 minutos.

Para la interpretación se hizo un frotis y se identificaron 200 espermatozoides que presentaban cola rizada, lo cual indicó que poseen membrana plasmática funcional, mientras que aquellos que mantenían su cola recta eran tomados en cuenta como espermatozoides con membrana dañada (Blandon et al., 2024).

4.6.9 Proceso de congelamiento

Para el proceso de congelamiento se dividió la colecta en dos, una parte en proceso tradicional y otra en automatizada. De igual forma antes de cada uno de los métodos se debe dejar reposar en la refrigeradora a 5°C por 4 horas.

Congelamiento de semen tradicional

Para el proceso de congelamiento tradicional se rellenó la caja de espuma con nitrógeno líquido hasta alcanzara el nivel de los soportes (4 cm). Las pajillas se colocaron horizontalmente sobre la gradilla a 3 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido. Luego se cerró la caja y se dejarán así durante 45 minutos. Al pasar este lapso, se sumergieron completamente en nitrógeno líquido y de forma inmediata se transfirieron al termo para almacenamiento.

Congelamiento de semen mediante Ice Cube

En el caso del uso de Ice Cube como método de congelamiento alternativo, se realizaron mediante un proceso automatizado propio de la máquina.

4.6.10 Interpretación de resultados

Se utilizó el software GrandRad prism 8.01, se procedió a realizar la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey para verificar la distribución de los datos con $P < 0.05$ en el caso de que la distribución sea normal las posibles diferencias entre las condiciones fueron verificadas utilizando la prueba Tstudent considerando como nivel de significancia $P < 0.05$.

V. RESULTADOS

5.1 Eosina- nigrosina

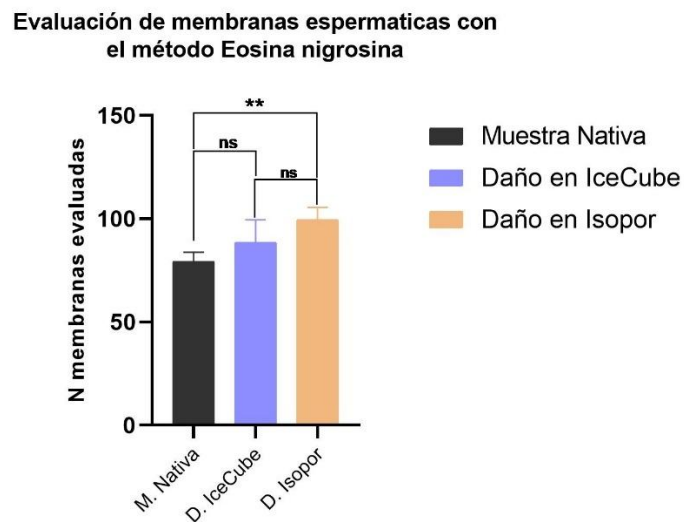


Gráfico 1: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 1 (Capitán).

No se observaron diferencias significativas entre muestra nativa e IceCube; sin embargo, Isopor mostró un aumento significativo en el número de espermatozoides teñidos.

Los espermatozoides del toro 1 fueron evaluados mediante la tinción de eosina-nigrosina para comparar la integridad estructural de la membrana entre la muestra nativa y los dos métodos de congelamiento. Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa entre los espermatozoides evaluados de la muestra nativa vs IceCube, sin embargo, si existe unas diferencias significativas entre la muestra nativa vs isopor, demostrando estos resultados que el mayor número de membranas dañadas

se mostró en el método de Isopor. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente $**P < 0.01$

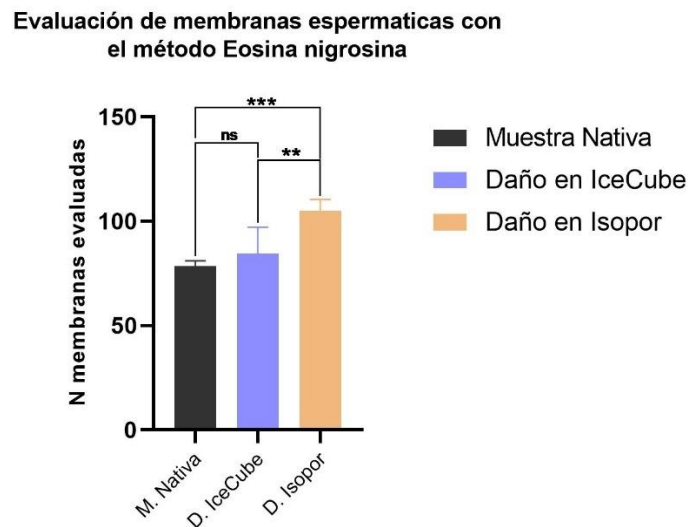


Gráfico 2: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 2 (Peanut).

La muestra nativa y IceCube no presentaron diferencias significativas, mientras que Isopor mostró un incremento marcado de células teñidas.

En los espermatozoides del toro 2, la tinción de EN evidenció un aumento progresivo en los resultados, donde no se observaron diferencias significativas de muestra nativa vs IceCube, sin embargo, si se encontró diferencias significativas entre nativa vs isopor, este patrón indica que ambos protocolos de criopreservación incrementaron el número de células teñidas, siendo Isopor el que generó un efecto más marcado en la integridad estructural. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente $*** p < 0.001$

Evaluación de membranas espermáticas con el método Eosina nigrosina

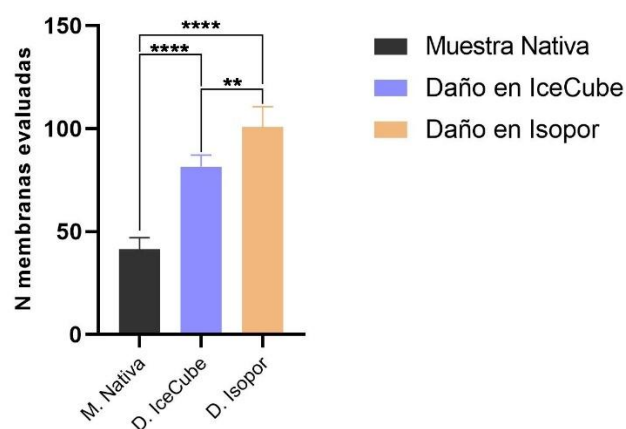


Gráfico 3: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 3 (Pablo).

Tanto IceCube como Isopor generaron aumentos en células teñidas respecto a la muestra nativa.

Para el toro 3, los resultados de los espermatozoides presentaron un patrón más contrastante con EN, ya que todas las comparaciones fueron significativas, detectadas mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, identificándose significancia entre la muestra nativa vs IceCube y nativa vs Isopor (**** $p < 0.0001$).

Evaluación de membranas espermáticas con el método Eosina nigrosina

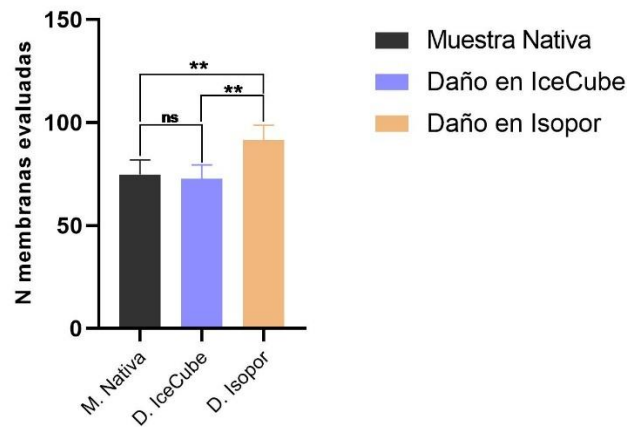


Gráfico 4: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 4 (Pompeye).

No hubo diferencias entre la muestra nativa e IceCube, pero sí entre nativa e Isopor.

Para los espermatozoides del toro 4, los resultados no reflejan diferencias significativas entre nativa e IceCube; sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas para nativa vs Isopor. Este comportamiento revela que la criopreservación afectó la integridad de la membrana de manera más evidente bajo el protocolo Isopor. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente ** $p < 0.0074$.

Evaluación de membranas espermáticas con el método Eosina nigrosina

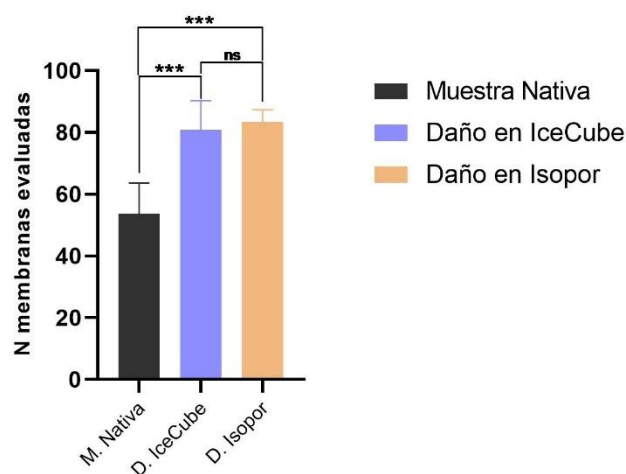


Gráfico 5: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Eosina-Nigrosina en toro 5 (Duque).

Ambos protocolos de congelamiento mostraron diferencias significativas respecto a la muestra nativa. IceCube e Isopor incrementaron el número de células teñidas.

En los espermatozoides del toro 5, los resultados registraron diferencias significativas entre ambos métodos: nativa vs IceCube y nativa vs Isopor. En este caso, ambos protocolos mostraron efectos similares, incrementando el número de células teñidas con respecto a la muestra nativa. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente *** $p < 0.0006$ para IceCube y *** $p < 0.0003$.

5.2 Test Hiposmótico

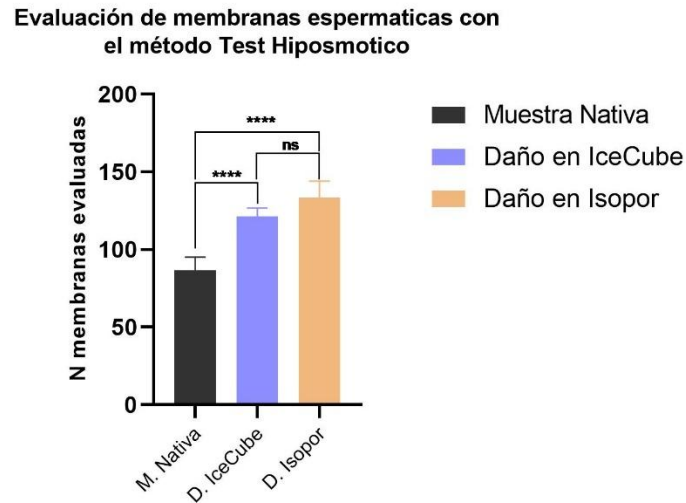


Gráfico 6: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test Hiposmótico en toro 1 (Capitán).

Tanto IceCube como Isopor mostraron incrementos significativos en la reactividad hiposmótica frente a la muestra nativa.

La evaluación hiposmótica para los espermatozoides del toro 1 mostraron un incremento claro en los resultados, reflejando diferencias significativas entre la muestra nativa y ambos protocolos de congelamiento, marcando como ambos métodos incrementaron la respuesta osmótica. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente ** $p < 0.0001$ para ambos métodos de congelamiento

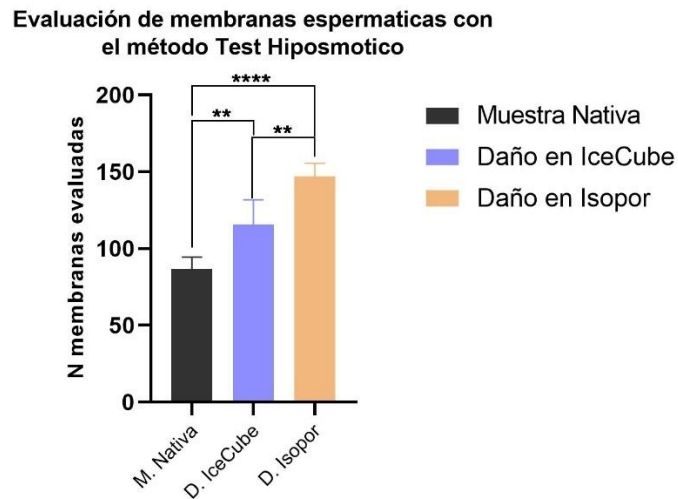


Gráfico 7: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test hiposmótico en toro 2 (Peanut).

Todas las comparaciones fueron significativas. IceCube e Isopor mostraron mayor reactividad que la muestra nativa

En los espermatozoides del toro 2, con el método de HOST, los resultados reflejan que todas las comparaciones resultaron significativas: nativa vs IceCube, nativa vs Isopor e IceCube vs Isopor, reflejándose que el protocolo Isopor cuenta con el mayor número de espermatozoide con cambio en la reactividad hiposmótica, seguido por IceCube. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente ** $p = 0.0047$ para IceCube y **** $p < 0.0001$ para Isopor.

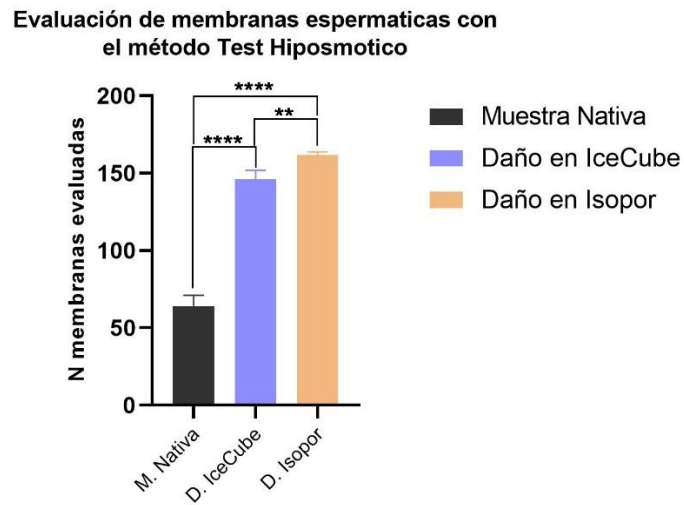


Gráfico 8: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test Hiposmótico en toro 3 (Pablo).

Tanto el método IceCube como Isopor mostraron aumentos significativos respecto a la muestra nativa.

En los espermatozoides del toro 3, el test hiposmótico mostró un comportamiento muy diferenciado entre protocolos. Los resultados muestran como las comparaciones fueron significativas: nativa vs IceCube, nativa vs Isopor. Este toro presentó el contraste más marcado de todo el grupo, evidenciando un fuerte impacto del proceso de criopreservación. Los datos obtenidos mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey arrojaron **** $p < 0.0001$ para ambos métodos.

Evaluación de membranas espermáticas con el método Test Hiposmótico

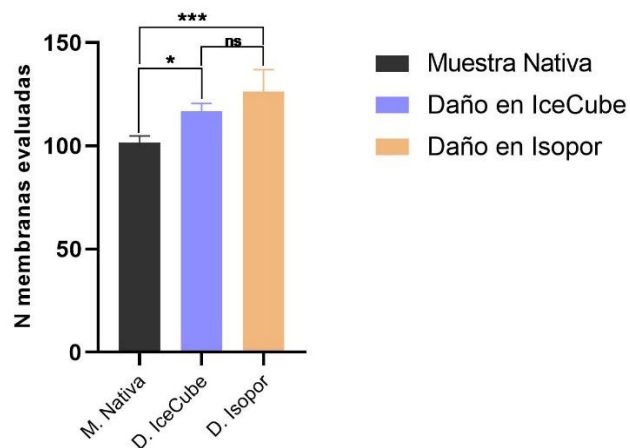


Gráfico 9: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test hiposmótico en toro 4 (Pompeye).

Se observaron diferencias significativas entre la muestra nativa e IceCube y entre nativa e Isopor. Ambos protocolos incrementaron la reactividad osmótica

Para el toro 4, los espermatozoides arrojaron resultados donde se identificaron diferencias significativas entre nativa e IceCube y entre nativa e Isopor, mientras que IceCube e Isopor no mostraron diferencias estadísticas. En este animal, ambos protocolos mejoraron la reactividad osmótica, con un efecto más marcado bajo Isopor. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, reflejando significancia de *** $p=0.0109$ para IceCube y * $p=0.0003$ para isopor.

Evaluación de membranas espermáticas con el método Test Hiposmotico

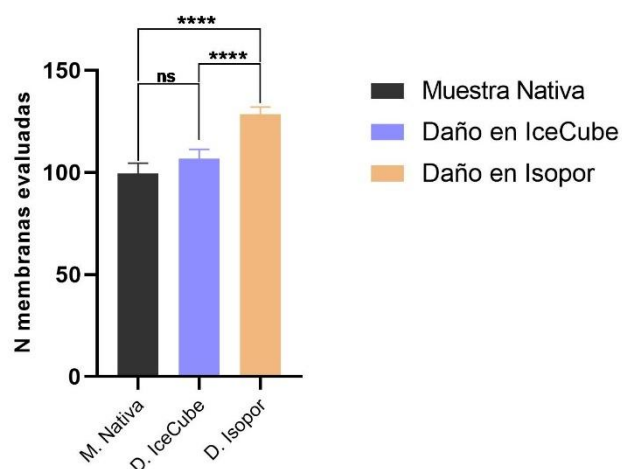


Gráfico 10: Evaluación de membranas espermáticas en proceso de congelamiento con protocolo de IceCube e Isopor con el método Test hiposmótico en toro 5 (Duque).

No se detectaron diferencias entre nativa e IceCube, pero sí entre nativa e Isopor.

En resultados de los espermatozoides del toro 5, no se observaron diferencias significativas entre nativa e IceCube; sin embargo, sí se identificaron diferencias marcadas entre nativa e Isopor. Este patrón indica que solo Isopor generó un aumento significativo en la respuesta hiposmótica. Las diferencias significativas se detectaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, cuando fue pertinente **** $p < 0.0001$.

VI. DISCUSIÓN

La evaluación de la integridad de la membrana espermática mediante la implementación de los métodos eosina-nigrosina y el test hiposmótico permitió identificar patrones consistentes de daño asociados al proceso de criopreservación, así como diferencias atribuibles tanto al protocolo de congelamiento como a la variabilidad individual entre los toros evaluados.

En todos los animales, las muestras nativas mostraron buenos resultados en cuanto a la integridad de la membrana espermática, mientras que las muestras congeladas incrementaron el número de células teñidas o con respuesta osmótica alterada. Este comportamiento confirma que el proceso de criopreservación-descongelamiento afecta de manera directa la estabilidad estructural y funcional de la membrana plasmática, concordando con lo descrito por Rubio-Guillén et al. (2009), quienes señalan que la criopreservación genera desorganización lipídica y pérdida de continuidad en la membrana.

En la utilización de la técnica de tinción eosina-nigrosina, las medias aumentaron consistentemente en los cinco toros tras el congelamiento, con valores más altos, bajo el protocolo de congelamiento Isopor. Este patrón fue particularmente evidente en los toros 2 y 3, donde la diferencia entre las muestras nativas y los tratamientos congelados fue marcada. Estudios previos han señalado que la membrana espermática funciona como el principal sitio de daño inducido por el descenso térmico, siendo susceptible al choque térmico y a la formación de cristales de hielo (Quintero-Moreno et al., 2011).

La magnitud del daño observado en Isopor concuerda con el hecho de que las curvas térmicas no controladas favorecen la transición abrupta de fases lipídicas y aumentan la probabilidad de ruptura de la bicapa (Dias et al., 2018). Los resultados del test hiposmótico confirmaron la tendencia encontrada en el método EN, mostrando aumentos claros en la reactividad osmótica en los toros 1, 2, 3 y 5, con diferencias significativas respecto a las muestras nativas. Este incremento está asociado a una pérdida de la capacidad de la membrana para regular el flujo hídrico, reflejo de un deterioro funcional que acompaña al daño estructural.

Según Nava-Trujillo et al. (2011), la respuesta al HOST depende de la integridad de la membrana y su capacidad de funcionar como osmómetro; por tanto, un aumento en la reactividad no necesariamente implica funcionalidad, sino que puede indicar fragilidad o pérdida de elasticidad.

El patrón comparativo entre los dos protocolos de congelación reveló que IceCube produjo efectos menos marcados significativamente que Isopor en la mayoría de los espermatozoides, fenómeno coherente con lo reportado en estudios sobre cinéticas térmicas controladas, donde se describe que sistemas programados permiten una transición más estable y reducen el impacto del enfriamiento sobre la membrana de esta célula (Forero-González et al., 2012). Esto se reflejó especialmente en los espermatozoides del toro 1, 2 y 4 en el método EN y del toro 5 con HOST, donde IceCube no mostró diferencia significativa, mientras que el método de Isopor mostro diferencia significativa para cada colecta.

La respuesta en IceCube sugiere que las curvas programadas limitaron la deshidratación excesiva y las variaciones abruptas de temperatura, aspectos clave para minimizar la lipoperoxidación y la pérdida de fluidez de la membrana (Witri et al., 2025). La variabilidad individual observada entre los toros también coincide con lo descrito en la literatura, donde se reconoce que la criotolerancia depende de factores intrínsecos, incluyendo la composición lipídica, la capacidad antioxidante y

las características fisiológicas de cada eyaculado (Rubio-Guillén et al., 2009; Witri et al., 2025).

En este estudio, los espermatozoides del toro numero 3 mostraron una diferencia particularmente amplia entre nativa y los protocolos congelados en ambas pruebas, mientras que los espermatozoides del toro 5 presentaron transiciones más graduales en IceCube. Estas diferencias individuales soportan la idea de que cada toro posee un perfil propio de respuesta al proceso de congelamiento-descongelamiento, concordando con estudios que reportan variabilidad interindividual significativa en bovinos (Forero-González et al., 2012).

Considerando ambos métodos diagnósticos los resultados muestran una coherencia clara, las alteraciones estructurales identificadas con eosina-nigrosina se acompañaron de pérdidas en la funcionalidad osmótica, reflejadas en el HOST. Este paralelismo confirma que la estabilidad de la membrana plasmática, esencial para la homeostasis celular y los procesos posteriores de capacitación y reacción acrosomal, se ve comprometida por el proceso de criopreservación, afectando potencialmente la capacidad fecundante del semen descongelado, como señalan estudios anteriores (Quintero-Moreno et al., 2011; Rubio-Guillén et al., 2009).

De forma global, el análisis conjunto de los espermatozoides de los 5 toros permite concluir que el proceso de congelamiento afecta la estructura y función de la membrana, con variaciones atribuidas tanto al protocolo como al individuo. Isopor mostró un efecto más marcado en ambos métodos diagnósticos, mientras que IceCube conservó una mayor estabilidad relativa. Estos resultados sugieren que las condiciones de enfriamiento controlado ofrecen ventajas importantes en la reducción del daño espermático, reforzando la necesidad de considerar la cinética térmica como un factor determinante en la eficiencia de la criopreservación.

VII. CONCLUSIONES

En síntesis, la comparación de los protocolos de congelamiento IceCube e Isopor permitió evidenciar que el proceso de criopreservación afecta la integridad de la membrana espermática en los toros Brahman evaluados. En ambos métodos diagnósticos (eosina-nigrosina y test hiposmótico) las muestras nativas mantuvieron mejores condiciones estructurales y funcionales, confirmando que el congelamiento y descongelamiento constituye un punto crítico para la estabilidad de la membrana plasmática.

La evaluación mediante eosina-nigrosina mostró que todos los toros presentaron un aumento en el número de células teñidas tras el congelamiento, con un impacto marcado bajo el protocolo Isopor. De igual forma, la determinación de la respuesta osmótica mediante HOST reveló diferencia significativos en la reactividad en la mayoría de los animales, indicando pérdida de funcionalidad de la membrana

Para finalizar, IceCube conservó una mayor estabilidad relativa frente a Isopor, lo que sugiere que las curvas térmicas controladas favorecen la preservación de la membrana espermática. En conjunto, estos resultados permiten concluir que el protocolo de congelamiento influye directamente en la calidad estructural y osmótica de los espermatozoides, aportando evidencia útil para optimizar los procedimientos de criopreservación en programas de reproducción bovina.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda aumentar el número de toros en futuros estudios, ya que una muestra más amplia aporta resultados más representativos y mejora la capacidad de comparar los efectos de los diferentes métodos de congelamiento.
- También se sugiere incluir animales de distintas razas para determinar si cada una responde de manera diferente al proceso de congelamiento, especialmente en lo relacionado con la integridad de la membrana espermática.
- Además, se aconseja incorporar técnicas diagnósticas adicionales (como otras tinciones o pruebas complementarias) que permitan detectar un rango más amplio de alteraciones y evaluar de forma más completa los daños espermáticos asociados a la criopreservación.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Algieri, C., Blanco-Prieto, O., Llavanera, M., Yeste, M., Spinaci, M., Mari, G., Bucci, D., & Nesci, S. (2023). *Effects of cryopreservation on the mitochondrial bioenergetics of bovine sperm*. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(1), 184–188. <https://doi.org/10.1111/rda.14261>

Dias, E. A. R., Campanholi, S. P., Rossi, G. F., Freitas Dell'Aqua, C. D. P., Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Zorzetto, M. F., De Paz, C. C. P., Oliveira, L. Z., Mercadante, M. E. Z., & Monteiro, F. M. (2018). *Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen*. *Animal Reproduction Science*, 195, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>

Espinoza Blandón, K. O., Travençolo, B. A. N., Martínez, A. F. F., Pinto Rojas, Y. D., Martins, M. C., Fontoura, K. A., Mineo, T. W. P., & Beletti, M. E. (2024). *The quality and characteristics of bovine sperm are compromised by Toxoplasma gondii antigens*. *Veterinary Parasitology*, 331, 110297. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110297>

Fernandez-Novio, A., Santos-Lopez, S., Barrajon-Masa, C., Mozas, P., de Mercado, E., Cáceres, E., Garrafa, A., González-Martín, J. V., Pérez-Villalobos, N., Oliet, A., Astiz, S., & Pérez-Garnelo, S. (2021). *Effects of extender type, storage time, and temperature on bull semen parameters*. *Biology*, 10(7), 630. <https://doi.org/10.3390/biology10070630>

Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., & Arruda, R. P. (2012). *Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes: Bovine sperm cryopreservation and cryoprotective agents*. *Andrologia*, 44, 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>

Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). *Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization*. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>

Hiew, M. W. H., Yeoh, B. N., Zainuddin, Z. Z., Sidik, S. A., Wong, S. T., Sipangkui, S., & Ahmad, A. H. (2023). *Semen cryopreservation in Bornean sun bear (*Helarctos malayanus euryspilus*)*. *Theriogenology Wild*, 3(6), 100057. <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100057>

Hitit, M., Ugur, M. R., Dinh, T. T. N., Sajeev, D., Kaya, A., Topper, E., Tan, W., & Memili, E. (2020). *Cellular and Functional Physiopathology of Bull Sperm With Altered Sperm Freezability*. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 581137. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.581137>

Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2017). *Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights*. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, S49–S56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>

Manjunath, P., & Thérien, I. (2002). *Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation*.

Journal of reproductive Immunology, 53, 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(01\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00098-5)

Morris, G. J., Acton, E., & Murray, B. J. (2011). *Freezing injury: The special case of the sperm cell*. Cryobiology, 64(2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.12.002>

Panner Selvam, M. K., Agarwal, A., Henkel, R., & Sharma, R. (2011). *Effect of semen dilution and cooling rates on semen quality in bulls*. Theriogenology, 75(4), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.012>

Pezo, F., Zambrano, F., Uribe, P., Andrade, A. F. C., & Sánchez, R. (2023). *Slow freezing of preserved boar sperm: Comparison of conventional and automated techniques on post-thaw functional quality by a new combination of sperm function tests*. Animals, 13(18), 2826. <https://doi.org/10.3390/ani13182826>

Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén, J., González-Villalobos, D., Carlos Gutiérrez, J., Madrid-Bury, N., & Garde López-Brea, J. J. (2011). *Identification of cryodamage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility*. Revista Científica, 21(5), 403–407. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95919362005.pdf>

Reproducción Veterinaria. (s. f.). *Fisiología reproductiva del macho*. Recuperado de <https://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/macho/fisiologia-reproductiva-del-macho/semen/>

Rodríguez, M., & colaboradores. (s. f.). *Manual práctico de procesamiento de semen bovino*. Recuperado de <https://angusdemexico.com/manual-practico-de-procesamiento-de-semen-bovino/>

Rubio-Guillén, J. L., Quintero-Moreno, A. A., & Villalobos, D. M. G. (2009). *Efecto De La Criopreservación Sobre La Integridad De La Membrana Plasmática Y Acrosomal De Espermatozoides De Toros*. Revista Científica, XIX(4), 382–389.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95911613010>

Sousa, F. H. de, Santos, E., Lima, G. L., Barros, F. F. P. C., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2013). *Avaliação morfológica e morfométrica dos espermatozoides do cateto (Pecari tajacu)*. Pesquisa Veterinária Brasileira, 33(7), 886–892.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000700014>

Trujillo, H. N., Moreno, A. Q., Meléndez, C. O., Guillén, J. R., Fernández, F. C., & Parra, G. F. (2011). *Use of water test to assess the sperm membranefunctional integrity in cryopreserved bull semen*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, 21(3).
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15642>

Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A. y Memili, E. (2019). *Advances in Cryopreservation of Bull Sperm*. Frontiers in Veterinary Science, 6, 268.
doi:10.3389/fvets.2019.00268

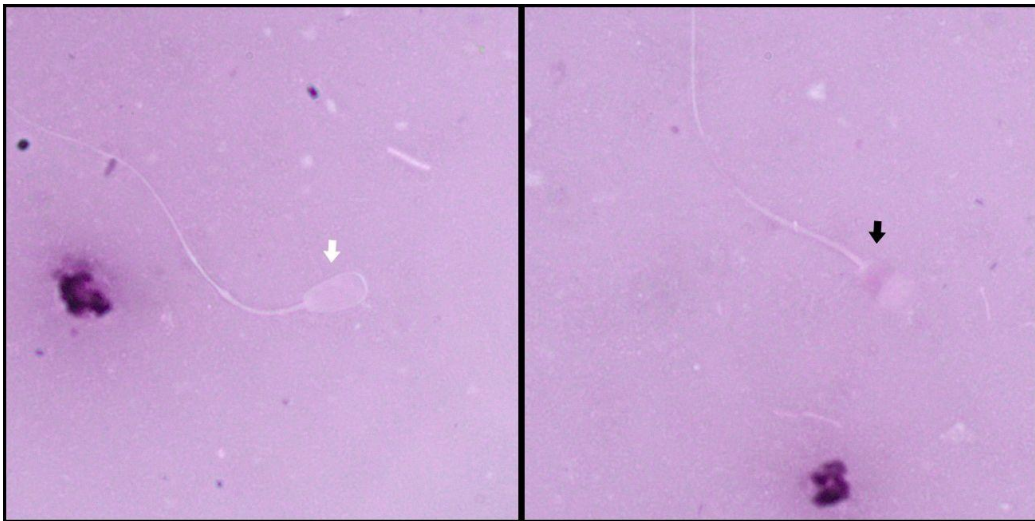
Witri, B. W., Arifiantini, I., Prasetyaningtyas, W. E., & Karja, N. W. K. (2025). *Frozen semen characteristics of bali bull in different age groups*. Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI), 12(1), 45–54.
<https://doi.org/10.55981/jbbi.2025.10087>

Wysokińska, A., & Kondracki, S. (2014). *Assessment of changes in sperm cell membrane integrity occurring during the storage of semen from genetically different*

males using two diagnostic methods. Canadian Journal of Animal Science, 94(4), 545–556. <https://doi.org/10.4141/CJAS2013-095>

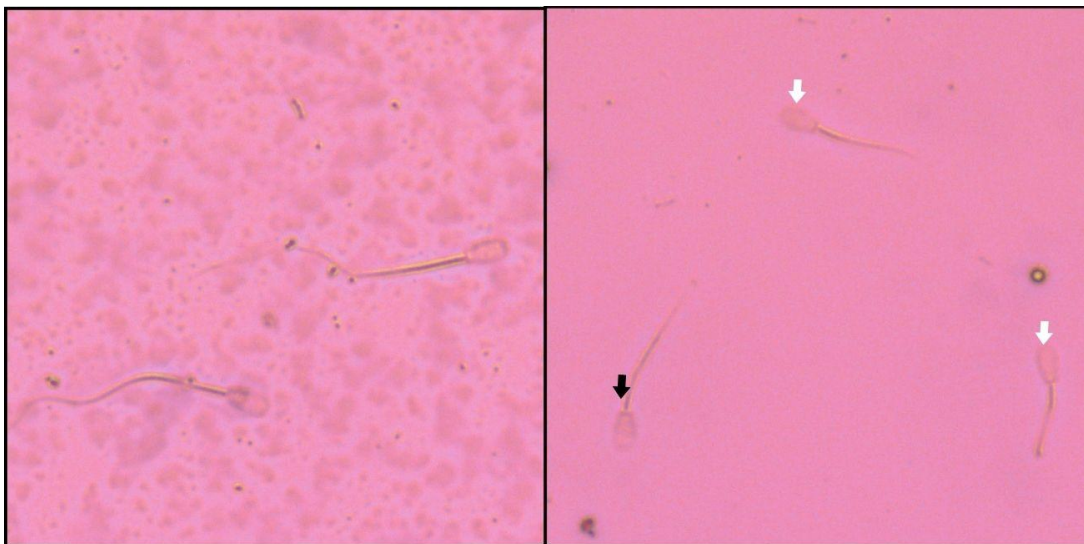
Yeoh, B. N., Zainuddin, Z. Z., Hiew, M. W. H., Sidik, S. A., Wong, S. T., Sipangkui, S., & Ahmad, A. H. (2023). *Semen cryopreservation in Bornean Sun Bear (Helarctos malayanus euryspilus)*. Theriogenology Wild, 3, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100057>

X. ANEXOS



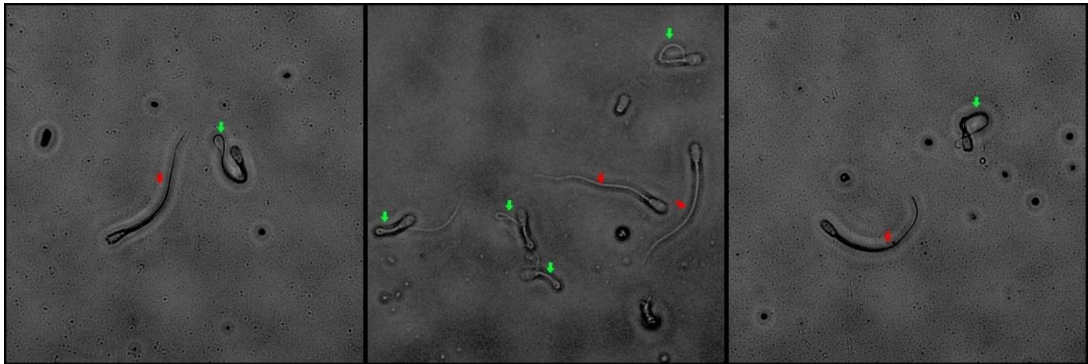
Anexo 1: Evaluación complementaria de integridad de membrana.

En la imagen A se observan espermatozoides con membrana íntegra, mientras que en la imagen B se muestran células con membrana dañada, evidenciando la diferencia morfológica utilizada para su clasificación.



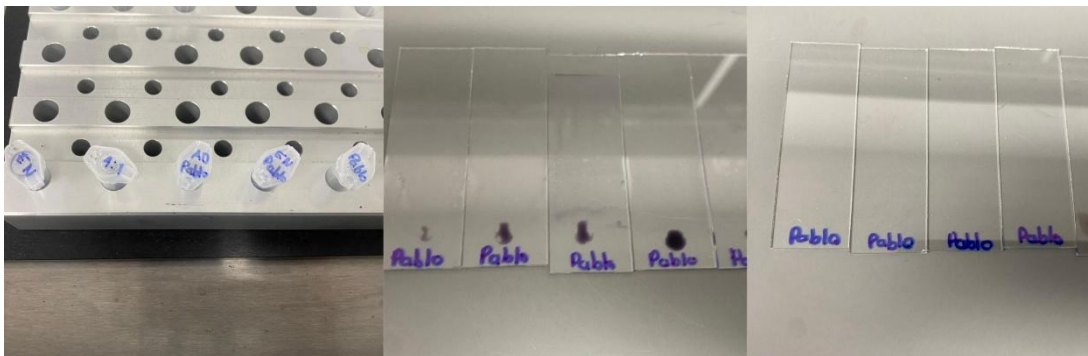
Anexo 2: Espermatozoides evaluados mediante la tinción eosina–nigrosina.

Las flechas blancas señalan células con membrana intacta (no absorben eosina), mientras que las flechas negras identifican espermatozoides con membrana dañada.



Anexo 3: Identificación de integridad de membrana mediante prueba hiposmótica (HOST).

Las flechas verdes indican células con respuesta osmótica positiva (cola curvada, membrana funcional), mientras que las flechas rojas señalan espermatozoides sin respuesta osmótica (membrana comprometida).



Anexo 4: Preparación de muestras y láminas para evaluación de integridad espermática.

Preparación inicial de las muestras correspondientes al toro Pablo.

La imagen A) muestra viales rotulados utilizados para preparación de muestras, y B) y C) son los portaobjetos preparados con eosina-nigrosina y test hiposmótico.



Anexo 5: Registro fotográfico de los toros utilizados en el estudio durante el proceso de colecta.

En la imagen A) se observa al toro Capitán, en la imagen B) al toro Peanut, y en la imagen C) al toro Pablo, cada uno en su respectiva estación de manejo.



Anexo 6: Registro fotográfico de los toros utilizados en el estudio durante el proceso de colecta.

En la imagen A) se observa al toro Pompeye, mientras que en la imagen B) se muestra al toro Duque durante su sujeción y manipulación en la manga de manejo.



Anexo 7: proceso de evaluación seminal realizado en campo y laboratorio.

En la imagen A) se observa la preparación inicial de insumos y recolección de materiales necesarios para el procesamiento de la muestra en campo. En la imagen B) se muestra el análisis computarizado de motilidad y concentración espermática. Finalmente, en la imagen C) se aprecia el proceso de empajillado de semen en el laboratorio, siguiendo los protocolos técnicos establecidos para la criopreservación.



Anexo 8: Equipos empleados para la implementación de los dos protocolos de congelamiento.

En la imagen A se muestra la estructura metálica utilizada para el proceso de congelamiento en la caja de isopor, diseñada para mantener las pajillas en suspensión a una altura fija sobre el nitrógeno líquido. En la imagen B se observa el equipo IceCube acompañado de los termos de nitrógeno líquido.



Anexo 9: proceso de congelamiento controlado de pajillas seminales utilizando el método de IceCube.

En la imagen A) se observa la cámara interna del equipo IceCube durante el proceso de descenso. En la imagen B) se muestra la unidad IceCube conectada al termo de nitrógeno líquido, donde se regula la temperatura y el flujo de vapor. Finalmente, en la imagen C) se aprecia la manipulación de las pajillas recién congeladas.