

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



USO DE DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL SOBRE LA
CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL MACHO
CABRÍO

Tesis

Que presenta SILVESTRE MORENO ÁVALOS
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Marzo 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

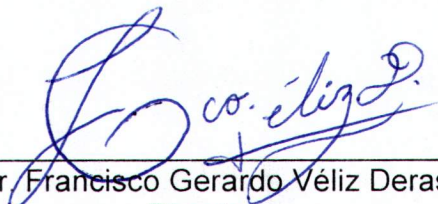


USO DE DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL SOBRE LA
CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL MACHO CABRÍO

Tesis

Que presenta SILVESTRE MORENO ÁVALOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA


Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Director


Dr. Oscar Angel García
Co-Director

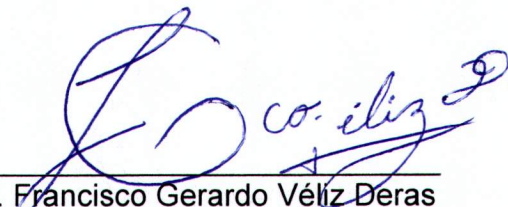
Torreón, Coahuila

Marzo 2021

USO DE DELUYENTES DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL SOBRE LA
CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL MACHO CABRÍO

Tesis

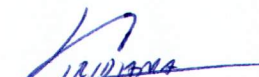
Elaborada por SILVESTRE MORENO ÁVALOS como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Asesor principal




Dr. Oscar Ángel García
Asesor



Dra. Viridiana Contreras Villarreal
Asesor




Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán
Asesor



Dr. Juan Ramón Luna Orozco
Asesor



Dra. Leticia R. Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Subdirector de Postgrado

DEDICATORIAS

A mi esposa e hijo.

Lorena y Daniel por ser mi motor de vida y siempre estar a mi lado, "Los Amo"

A mis padres

Amparo y Jesús; desde donde quiera que estén por que se que están contentos y orgullosos con mis logros, "un bote menos que cargar".

A mis hermanos

Carmen, Guadalupe, Martha y Ernesto porque siempre están conmigo dándome ánimos.

Especialmente a mi gran amigo David

por ser mi amigo porque mis triunfos siempre serán sus triunfos siempre vivirás en mi corazón

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS ARTÍCULOS

Fwd: RESPONDER

De: Sergio Martínez-González <abanicoveterinario@gmail.com>

Enviado: martes, 26 de enero de 2021 9:44 p. m.

Para: Oscar Angel

Asunto: Re: RESPONDER

A quien corresponda:

El que suscribe **Sergio Martínez González**, Editor en Jefe de la revista **ABANICO VETERINARIO**, hace constar que en los archivos administrativos de la revista se encuentra **ACEPTADO** para su publicación el artículo con clave, título y autores siguientes:

Clave 2020-75

Determinación de la calidad del semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo, en machos cabrios

Determination of the quality of semen cryopreserved with soy lecithin or egg yolk, in male goats

Moreno-Avalos Silvestre¹ ID, Veliz-Deras Francisco² ID, Calderon-Leyva Guadalupe¹ ID, Contreras-Villarreal Viridiana² ID, Guillen-Muñoz Juan² ID, Angel-García Oscar^{* 2} ID

Dicho artículo será publicado en el volumen 2021, después de la edición y traducción. El artículo será publicado una vez enviado el comprobante de depósito de \$8120.00 pesos mexicanos. En México depositar en Banco Scotiabank, Cuenta Bancaria 01401150472, CLABE INTERBANCARIA 044560014011504728; en otros países enviar a Banco Scotiabank, Número de SWIFT: MBCOMXMM, Cuenta Bancaria 01401150472. A Nombre de Sergio Martínez González. Enviar depósito escaneado, datos de dirección postal y datos para factura al correo abanicoveterinario@gmail.com

Se extiende la presente para los fines legales que haya lugar en la Ciudad de Tepic, Nayarit; a 15/01/2021.



Para dar mejor seguimiento al manuscrito debe contestar usando RESPONDER y así se forma la cadena o historia de archivos y revisiones del manuscrito.

Sergio Martínez González. Móvil Cel (52-311) 1221626

ABANICO ACADEMICO

Editor en Jefe de las revistas ABANICO VETERINARIO (Index Conacyt) y ABANICO AGROFORESTAL.

Coordinador del Congreso Internacional Abanico Veterinario, Agroforestal, Pesquero y Acuícola.

<https://abanicoacademico.mx/>

<https://www.facebook.com/abanicoacademico/>



Art. silvestre_ Research Article submission (Indian Journal of Animal Research)

📎 2 ✓

Asunto: RE: Research Article submission (Indian Journal of Animal Research)
Para: smavalos91@hotmail.com
Cc:

Thank you for the email and for your interest in the journal. On the first assessment article is passed by the Editor for further reviewer process. Below is an article processing schedule from the date of Submission in Indian Journal of Animal Research.

Normal Process of the article:-

Charges US\$ 650

Review Process 3 to 5 months

Online publication with DOI number 6 to 9 months

Print Publication with Volume, Issue and Page number 12 to 15 months

Fast Track Online Publication with DOI Number :-

Charges US\$ 850

Review Process 1 to 3 months

Online Publication with DOI Number 3 to 5 months

Print Publication as per normal process of the article 12 to 15 months

Fast Track Complete Publications of article :-

Charges US\$ 1250

Review Process 1 to 3 months

Online Publication with DOI Number 3 to 5 months

Complete Publication with Volume, Issue and Page Number 6 to 9 months

Author is requested to select any of the above process initially so that article can be proceed further accordingly. Please feel free to contact for any other assistance.

Author needs to remit the charges after the approval of the article.

P.S. - As per journal term, any discount and waiving off charges is not possible because it will be unfair for other authors of the journal. It is not possible for us to give concession or wave off the charges.

Best Regards

Gaurav Gupta

Associate Managing Editor

Agricultural Research Communication Centre |

294, Narsi Village Part II, Sector 33 | Karnal - 132001 | Haryana (INDIA) |



ÍNDICE DE CONTENIDO

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS ARTÍCULOS	iii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Avances en la criopreservación del semen	4
3.2 Desafíos en la criopreservación del espermatozoide	5
3.3 Cambios en la membrana espermática.....	6
3.4 Especies reactivas de oxígeno	7
3.5 Desarrollo de diluyentes	8
3.6 Estado actual del uso de los diluyentes en el macho.....	8
3.7 Yema de huevo en la preservación del semen.....	8
3.8 Efecto de diferentes tipos de yema de huevo sobre la calidad seminal.....	10
3.9 Uso Tris-Yema de Huevo y Citrato-Yema de Huevo	12
3.10 Uso de diluyentes de origen vegetal en la criopreservación del semen.....	12
IV. LITERATURA CITADA	15
V. ARTÍCULOS	20
VI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	42

RESUMEN

USO DE DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL MACHO CABRÍO

SILVESTRE MORENO AVALOS

Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Se evaluó el uso de diluyentes de origen animal y vegetal sobre la criopreservación del espermatozoide en el macho cabrío. Experimento 1. un total de 24 eyaculados, y cada eyaculado fue dividido en tres partes iguales y diluido con AndroMed® (1% de lecitina de soya, LS); Optidyl® con 20% (v/v) de Tris-yema de huevo; TY), y un diluyente a base de citrato-yema de huevo (CY), para semen fresco (SF), semen refrigerado (SR) y semen congelado (SC). No existieron diferencias ($p>0.05$) entre diluyentes en el SF respecto a motilidad masal (MM; 4.7 ± 0.26), viabilidad espermática (VE; 74.1 ± 1.66) y motilidad individual (MI; 62.3 ± 4.0). Al igual que en el SR no existió diferencia ($p>0.05$) entre diluyentes respecto a MM= 3.83 ± 0.4 , y MI= 52.1 ± 6.0 . La VE varió ($p<0.05$) fue menor en LS vs. CY y TY (51.0 ± 13.0 vs 71.3 ± 3.0 y 69.0 ± 3.1). Respecto al SC, la MM, MI y VE favorecieron ($p<0.05$) al diluyente TY vs. LS y CY (2.4 ± 0.5 , 32.5 ± 8.3 , 41.3 ± 13.0). Experimento 2. El semen fue diluido con dos diluyentes a base 15% citrato- YH de codorniz (CYC), o gallina (CYG) y un diluyente con 20% (v/v) de Tris-YH (Optidyl®; OP), en SF, SR y SC. No existieron diferencias ($p>0.05$) entre diluyentes para la MM (4.7 ± 0.4), VE (86.8 ± 4.3), morfología (MF; 88.0 ± 5.1) y HOST (91.1 ± 3.3) en los tres diluyentes utilizados. Los resultados del primer experimento mostraron una mejor criopreservación del semen caprino con el diluyente Tris-yema respecto al de lecitina de soya, mientras que los resultados del segundo experimento no mostraron diferencias.

Palabras clave: Lecitina de soya, semen caprino, codorniz.

ABSTRACT

USE OF DILUENTS OF ANIMAL AND VEGETABLE ORIGIN ON THE CRYOPRESERVATION OF SPERMATOZOID IN THE MALE GOAT

SILVESTRE MORENO GUARANTEES

Doctor of Science in Agricultural Production

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

The use of diluents of animal and vegetable origin was evaluated on the cryopreservation of the sperm in the male goat. Experiment 1. A total of 24 ejaculates, and each ejaculate was divided into three equal parts and diluted with AndroMed® (1% soy lecithin, LS); Optidyl® with 20% (v / v) Tris-egg yolk; TY), and a citrate-egg yolk diluent (CY), for fresh semen (SF), chilled semen (SR) and frozen semen (SC). There were no differences ($p > 0.05$) between diluents in the SF regarding mass motility (MM; 4.7 ± 0.26), sperm viability (VE; 74.1 ± 1.66) and individual motility (MI; 62.3 ± 4.0). As in the SR, there was no difference ($p > 0.05$) between diluents with respect to MM = 3.83 ± 0.4 , and MI = 52.1 ± 6.0 . The VE varied ($p < 0.05$) was lower in LS vs. CY and TY (51.0 ± 13.0 vs 71.3 ± 3.0 and 69.0 ± 3.1). Regarding SC, MM, MI and VE favored ($p < 0.05$) the diluent TY vs. LS and CY (2.4 ± 0.5 , 32.5 ± 8.3 , 41.3 ± 13.0). Experiment 2. The semen was diluted with two diluents based on 15% citrate-YH of quail (CYC), or chicken (CYG) and a diluent with 20% (v / v) of Tris-YH (Optidyl®; OP), in SF, SR and SC. There were no differences ($p > 0.05$) between diluents for MM (4.7 ± 0.4), VE (86.8 ± 4.3), morphology (MF; 88.0 ± 5.1) and HOST (91.1 ± 3.3) in the three diluents used. The results of the first experiment showed a better cryopreservation of goat semen with the diluent Tris-yolk compared to that of soy lecithin, while the results of the second experiment did not show differences.

Keywords: Soy lecithin, egg yolk, goat semen, quail.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de diluyentes tradicionales incluyen la yema de huevo (YH) de gallina (*Gallus domesticus*) que son agregados al semen para la preservación de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante la crioconservación (Lima-Verde *et al.*, 2017), debido a que protege al espermatozoide de los daños inducidos por la crioconservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación debido a su acción crioprotectora que son los fosfolípidos, colesterol y proteínas de baja densidad (Andrabi *et al.*, 2008; Akçay *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2016), ya que puede ayudar en la resistencia del shock por frío en asociación con otros componentes (Amirat *et al.*, 2004). Los fosfolípidos de la YH reemplazan a los fosfolípidos de la membrana espermática con mayor facilidad para mantener la estructura y función de la membrana plasmática durante el proceso de crioconservación (Akçay *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2016).

Se ha reportado, que los diluyentes que contienen YH de distintas especies de aves, los de la gallina domestica han resultado ser significativamente mayores en motilidad y longevidad en espermatozoides congelado (Khaliq *et al.*, 2017). Por otra parte, varios estudios han mostrado que la YH de pato, codorniz o gallina tiene diferentes componentes de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, lo que resulta en diferentes efectos en el proceso de criopreservación sobre los espermatozoides (Trimeche *et al.*, 1997; Bathgate *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2013).

En lo que se refiere a la YH, se han encontrado algunos componentes indeseables (hormonas esteroideas y sus moléculas precursoras) se consideran perjudiciales para la integridad del espermatozoide (Akhter *et al.*, 2012; Lima-Verde *et al.*, 2017). Sin embargo, en los últimos años, se ha opinado frecuentemente en contra del uso de la YH debido a la gran variabilidad de sus componentes, lo que hace que la evaluación de sus beneficios sea compleja (Kulaksız *et al.*, 2010), además se ha tratado de evitar el uso de diluyentes de origen animal, ya que podrían ser una posible ruta de transmisión de enfermedades (Lima-Verde *et al.*, 2017; Ansari *et al.*, 2017). De manera particular, en el macho cabrío, existen interacciones negativas entre los

fosfolípidos de la YH y la glándula bulbouretral, esta glándula secreta con el plasma seminal una enzima coagulante de la YH, la cual cataliza la hidrólisis de la lecitina de la YH en ácidos grasos y lisolecitina, que son citotóxicos (Ngoma *et al.*, 2016). Por lo anterior, se han utilizado sustitutos de la YH químicamente definidos sin ser de origen animal (El-Sisy *et al.*, 2016; Gamal *et al.*, 2016), elaborados en a base de lecitina de soya y que pueden ser alternativas potenciales para la criopreservación del semen (Akhter *et al.*, 2012).

En este contexto, merecen atención especial los diluyentes elaborados en base a YH en cuanto a sus componentes y su efecto en comparación con los diluyentes basados en liposomas. Debido a que el efecto de los componentes mencionados anteriormente es poco conocido sobre la calidad del semen criopreservado en el macho cabrío nos planteamos el objetivo de comparar los efectos de un diluyente a base de lecitina de soya o YH sobre la calidad del semen, conservado por refrigeración y congelación

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

Hipótesis

La lecitina de soya mantiene la calidad seminal durante el proceso de criopreservación en comparación con la yema de huevo de diferentes especies (gallina y codorniz).

Objetivo

Comparar la calidad seminal durante el proceso de criopreservación (es decir, refrigerado y después de congelado) utilizando un diluyente de origen vegetal a base de lecitina de soya y dos diluyentes a base de yema huevo (gallina y codorniz).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Avances en la criopreservación del semen

La criopreservación del semen se ha convertido en un aspecto importante de la industria ganadera, donde la inseminación artificial (IA) es la técnica más ampliamente aplicada para facilitar la utilización y distribución extensiva del semen (Miguel-Jimenez *et al.*, 2020). Mediante el uso de semen criopreservado e IA, se puede utilizar el espermatozoide de los mejores reproductores para inseminar a miles de hembras en todo el mundo. Aunque, actualmente la criopreservación del semen en toros ha avanzado en comparación con el semen de otras especies. Sin embargo, todavía existen importantes lagunas en las bases de conocimiento y tecnología (Ugur *et al.*, 2019). La viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación sigue siendo baja y difiere significativamente entre las especies y razas de reproductores (Kulaksız *et al.*; 2010; Ugur *et al.*, 2019).

Por otra parte, el proceso de criopreservación del semen puede resultar en un mayor estrés oxidativo en los espermatozoides debido a la peroxidación de lípidos de la membrana durante el proceso de congelación, lo que conduce a la producción de oxidantes como especies reactivas de oxígeno (ROS), mayor cantidad de fragmentación del ADN y alteración en la estructura de los fosfolípidos de la membrana plasmática que pueden inducir una capacitación prematura o exocitosis acrosómica (Miguel-Jimenez *et al.*, 2020).

Las técnicas de criopresevación para el almacenamiento del semen en algunas especies pueden afectar la calidad postdescongelación, por ejemplo en el carnero tiene muchas ventajas, pero el proceso de congelación y descongelación induce ciertos efectos perjudiciales, en términos de estructura del esperma, daño bioquímico y funcional, lo que resulta en una reducción de la motilidad del esperma, la integridad de la membrana y la capacidad de fertilización (Salomon y Maxwell, 2000; Tekin *et al.*, 2006).

Las fallas en las técnicas de criopreservación son debilidades importantes porque están impidiendo avances tanto en la ciencia fundamental de los gametos de mamíferos como en la biotecnología reproductiva. Se han desarrollado varios diluyentes y se han complementado con productos químicos para reducir el daño criogénico o el estrés oxidativo con distintos niveles de éxito. Se han descubierto conocimientos más detallados sobre la morfología y función de los espermatozoides mediante la aplicación de herramientas avanzadas en biología molecular y celular moderna (Kulaksız *et al.*; 2010).

3.2 Desafíos en la criopreservación del espermatozoide

La criopreservación del semen es una rutina utilizada para preservar la capacidad de fertilización de los espermatozoides para que pueden almacenarse fácilmente y transportarse durante más tiempo. Diferentes factores son responsables del grado de éxito en el proceso de criopreservación del semen, siendo el más importante la composición del diluyente (Khaliq *et al.*, 2017).

El éxito de la IA con semen congelado depende entonces, principalmente de la técnica de criopreservación de espermatozoides (Wang *et al.*, 2015). Los procesos de criopreservación de semen particularmente (refrigeración, congelación y descongelación) son las principales causas de shock frío, formación de cristales de hielo intracelular y producción de ROS. Todos estos cambios nocivos provocan ciertas lesiones físicas y funcionales que posteriormente resultan en la pérdida de viabilidad, motilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides (Javed *et al.*, 2019).

A diferencia de otras células del cuerpo, los espermatozoides deberían ser menos sensibles al daño provocado por la criopreservación, lo anterior, debido a su bajo contenido de agua y alta fluidez de las membranas. A pesar de esto, la criopreservación resulta perjudicial para la integridad de los espermatozoides debido a alteraciones en la estructura, función de la membrana y el metabolismo celular (Ugur *et al.*, 2019).

Lo anterior, resultar en un mayor estrés oxidativo en las células espermáticas debido a la peroxidación lipídica de la membrana durante el proceso de congelación, lo que conduce a la producción ROS, fragmentación del ADN y en la estructura de la membrana plasmática (Layek *et al.*, 2016). Se han hecho numerosos intentos para reducir el daño a los espermatozoides mediante la modificación de los diluyentes, así como en los protocolos de congelación. Diferentes variantes de la YH- Tris y los diluyentes a base de leche han sido la base de los diluyentes más utilizados para la criopreservación de espermatozoides de toro (Miguel-Jimenez *et al.*, 2020).

La YH (YH) es la opción más común en los diluyentes utilizados para la congelación de espermatozoides (Layek *et al.*, 2016). Sin embargo, la composición de la YH es muy variable, por lo que es difícil producir diluyentes estandarizados para la criopreservación (Bathgate *et al.*, 2006; Lima-Verde *et al.*, 2018).

Baust *et al.* (2009) resumen que los factores estresantes que influyen en las células durante la etapa de enfriamiento y congelación son las siguientes: (1) Durante el enfriamiento, las células se exponen a muchos efectos nocivos, incluyendo desacoplamiento metabólico, desequilibrio, desbalance iónico, activación de proteasas, acidosis celular, privación energía, la transición de la fase de membrana, la desestabilización de la citoesqueleto, y la producción de ROS, (2) Durante el proceso de congelación, los espermatozoides son predispuesto a los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo, hiperosmolaridad, alteraciones el volumen celular y desnaturalización de proteínas.

3.3 Cambios en la membrana espermática

La motilidad de los espermatozoides, la integridad de la membrana plasmática y la integridad acrosómica son parámetros fundamentales para la predicción del potencial fertilizante de los espermatozoides en experimentos de laboratorio y programas de IA (Ansari *et al.*, 2017).

La principal causa de lesiones celulares en la criopreservación es el daño sufrido por la membrana plasmática. Inicialmente se suponía que el choque frío se asociaba con la composición lipídica de la bicapa de la membrana (Ansari *et al.*, 2017; Kulaksız *et al.*, 2017; Ugur *et al.*, 2019).

La criopreservación da como resultado una pérdida del 40-50% de los espermatozoides viables totales en un proceso de congelación-descongelación basado en la rutina que conduce a una reducción en la fertilidad y grandes pérdidas económicas asociadas a la fertilidad. La reducción en la viabilidad del de espermatozoide y la disminución en la fertilidad se deben a la criolesión de los espermatozoides durante la congelación que es causada principalmente por el choque frío, el estrés osmótico, la formación de cristales de hielo y el daño oxidativo (Kulaksız *et al.*, 2017).

Cuando la temperatura se reduce durante el proceso de enfriamiento, las restricciones de movimiento lateral fosfolípido inducen un cambio del líquido a la fase de gel haciendo que la membrana se vuelva más rígida y frágil. Los cambios de fase que afectan a las membranas lipídicas llevan a la separación de la fase lipídica; por lo tanto, las proteínas se agrupan irreversiblemente (Ugur *et al.*, 2019).

3.4 Especies reactivas de oxígeno

Durante la criopreservación, cualquier cambio en la fluidez de la membrana mitocondrial puede dar lugar a la liberación de ROS y cambios en el potencial de membrana (Javed *et al.*, 2019). Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico (ON) y el anión superóxido (O₂⁻) tienen efectos sobre la señalización intracelular, la capacitación de espermatozoides y reacciones de acrosoma (Ugur *et al.*, 2019). Aunque en los niveles apropiados de estas moléculas juegan un papel importante en la fisiología de los espermatozoides, a saber, la capacitación y la reacción acrosómica, son perjudiciales a la función espermática a altas concentraciones debido a la toxicidad. El mecanismo exacto de la generación y la función ROS no han sido completamente caracterizado en espermatozoides. Sin embargo, se

sabe que estas moléculas son productos de reducción incompleta de oxígeno, y la toxicidad se asocia con la inactivación de proteínas debido a la ionización, la peroxidación lipídica y el daño en el ADN (Ugur *et al.*, 2019).

3.5 Desarrollo de diluyentes

3.6 Estado actual del uso de los diluyentes en el macho

El choque frío que se soporta durante la congelación y descongelación reduce la calidad de los espermatozoides. El alcance de las lesiones causadas por el choque frío varía según la concentración de los diluyentes, crioprotectores y especies (Ugur *et al.*, 2019). Varios diluyentes han sido desarrollados para disminuir el daño por la criopreservación y mejorar la viabilidad posterior al deshielo. Los diluyentes basados en 20% de YH se utilizan comúnmente para criopreservar el esperma de toros, búfalo y cerdos (Bathgate *et al.*, 2006).

Aunque se sabe que la YH previene el daño celular durante la criopreservación, la presencia de sustancias en gránulos de yema incluyendo lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y minerales inhiben respiración de las células espermáticas y reducir su motilidad (Moussa *et al.*, 2002). Sin embargo, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) la YH protegen a los espermatozoides del daño cubriendo la membrana espermática durante la congelación y descongelación. Aunque la mayoría de los diluyentes incluyen YH sola, algunas se complementan con glicerol, y hay algunas preocupaciones sobre la bioseguridad y la posibilidad de que el contenido del huevo pudiera alterar la estructura y fisiología de los espermatozoides (Ugur *et al.*, 2019).

3.7 Yema de huevo en la preservación del semen

La YH o leche son los diluyentes tradicionales que se agregan al semen para preservar la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante el

almacenamiento (Lima-Verde *et al.*, 2018). Los diluyentes a base de YH se han utilizado durante mucho tiempo para la criopreservación de espermatozoides entre especies de ganado. En realidad, es el contenido de lecitina de la YH entera lo que proporciona crioprotección a los espermatozoides, mientras que al mismo tiempo contiene agentes anticrioprotectores como hormonas esteroideas y gránulos de yema que son inevitables cuando se usa la YH entera.

La YH es el crioprotector más utilizado en la composición de los diluyentes para la criopreservación de los espermatozoides de mamíferos; sin embargo, se han hecho esfuerzos para encontrar sustitutos. No solo la YH es un potencial riesgo de bioseguridad (El-Sisy *et al.*, 2018), por la posibilidad de transportar microorganismos patógenos entre países, pero además no es un componente estandarizado, siendo dependiente de factores como la dieta y manejo de las gallinas que producen los huevos (Ansari *et al.*, 2016). Además, la YH puede contener metabolitos y endotoxinas dañinos que afectan la viabilidad de los espermatozoides (Vidal *et al.*, 2013) u hormonas esteroideas que reducen la motilidad de los espermatozoides (El-Sisy *et al.*, 2018).

Lo anterior, ha llevado que en los últimos años se busquen alternativas para evitar el material de origen animal, ya que podría ser una posible vía de transmisión de enfermedades y se han hecho esfuerzos para encontrar sustitutos (Lima-Verde *et al.*, 2017).

Raheja *et al.*, (2018) mencionan que la YH es un crioprotector no penetrante utilizado durante la crioconservación que contiene fosfatidilcolina (lecitina), fosfolípidos, extractos lipídicos, fracciones de lipoproteínas y lipoproteínas específicas que brindan protección contra el choque frío. La fracción fosfolípida de una fracción de LDL proporciona protección contra el choque por frío.

La capacidad protectora de la YH en la criopreservación se debe a la unión de algunos componentes con la membrana plasmática de los espermatozoides. El contenido de glicoproteínas y fosfolípidos en la YH recubren las membranas de

gametos, que podrían alterar la disponibilidad de proteínas del plasma seminal y la respuesta de los espermatozoides a la adición (Ramirez-Vasquez *et al.*, 2019). Ramirez-Vasquez *et al.*, (2019) menciona que Bergeron y Manjunath (2006) sugieren que los componentes de la YH actúan como película protectora en la superficie del espermatozoide, aunque sin reemplazar la membrana del espermatozoide por fosfolípidos por fosfatidilcolinas de YH.

3.8 Efecto de diferentes tipos de yema de huevo sobre la calidad seminal

Tradicionalmente el uso de YH de gallina (*Gallus domesticus*) es utilizado para la preservación de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante la criopreservación debido a que protege al espermatozoide de los daños inducidos por la criopreservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación, lo anterior, debido a su acción crioprotectora que son los fosfolípidos, colesterol y proteínas de baja densidad (Akçay *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2016), ya que puede ayudar en la resistencia del shock por frío en asociación con otros componentes (Amirat *et al.*, 2004). Los fosfolípidos de la YH reemplazan a los fosfolípidos de la membrana espermática con mayor facilidad para mantener la estructura y función de la membrana plasmática durante el proceso de criopreservación (Zhang *et al.*, 2009).

La concentración óptima de YH de gallina generalmente es utilizado en diluyentes para la criopreservación del semen bovino al 20% (Amirat *et al.*, 2004). Tremchi *et al.* (1997) encontraron que los diluyentes que contienen 10% de YH de codorniz producen mejores resultados que la YH de gallina en la criopreservación del semen.

La capacidad crioprotectora de las distintas YH (fresca, clarificada o en polvo) añadida en los medios de conservación, han mostrado superioridad sobre los parámetros de calidad del espermatozoide después de la descongelación. El uso de la YH clarificada no ofrece ningún beneficio en comparación con la YH fresca, lo

que complica el proceso de preparación de dichos medios de conservación. Por lo tanto, el procedimiento de lavado de espermatozoides y el uso de YH en polvo se puede recomendar como el reemplazo de la YH fresca por su eficacia y medidas de seguridad para criopreservar espermatozoides de macho (Tabarez *et al.*, 2017). La YH en polvo puede utilizarse como sustituto de YH fresco en los diluyentes de conservación y refrigeración de semen de alpacas (García *et al.*, 2017).

Resultados encontrados por García *et al.*, (2017) al comparar la YH en polvo con YH fresco en ovinos de la raza Guirra respecto a la integridad del acrosoma, encontraron un incremento significativo en la motilidad total en semen refrigerado (SR) a favor de la YH en polvo. Mientras que Fernández-Santos *et al.* (2006) observaron una mejora en la calidad espermática con el uso de YH clarificado en SR de espermatozoides del ciervo Ibérico. Las diferencias en resultados entre especies pueden deberse a las diferencias en la composición de membrana plasmática, en el porcentaje de YH adicionado al diluyente, en los aditivos incluidos y en el tiempo de refrigeración (Fernández-Santos *et al.*, 2006; Waterhouse *et al.*, 2006).

Khaliq *et al.* (2017) observaron que la disminución en la concentración de YH de codorniz del 20% al 5% dio como resultado una disminución de la motilidad, viabilidad, integridad del plasmolema, porcentaje de acrosoma funcional y otros índices característicos de motilidad basados en el CASA después de la descongelación. Estos resultados revelaron que la sustitución del 20% de YH de gallina por 20% de de YH de codorniz en los criodiluyentes mejoran los parámetros de calidad del semen posterior a la descongelación de los espermatozoides de búfalo Nili-Ravi. Además, la sustitución de la misma concentración de YH de gallina con YH de *Anatidae anas platyrynchos* (pato) en criodiluyentes resultó en un aumento de las características post descongelación de la motilidad, viabilidad con una disminución significativa de las deformidades de la cola (Waheed *et al.*, 2012).

3.9. Uso Tris-Yema de Huevo y Citrato-Yema de Huevo

Raheja *et al.*, (2018) dicen que el diluyente de glicerol de yema de huevo con Tris se desarrolló por primera vez en 1963 tanto para semen fresco como congelado. Tris-yema-glicerol, Tris-fructosa-yema-glicerol y Citrato-yema-fructosa-glicerol son los diluyentes a base de Tris y citrato más utilizados para congelar el semen bovino Penetrante. El agente crioprotectivo (CPA, por sus siglas en inglés) como el glicerol previene el efecto de concentración (efecto de solución) de los medios extracelulares. El glicerol (7%) es el CPA más utilizado para los espermatozoides de toro con diluyentes citrato-yema y Tris-yema de huevo.

Se han desarrollado diferentes tipos de diluyentes manteniendo el objetivo de mantener la máxima fertilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento. Tris-yema-glicerol, tris-fructosa-yema-glicerol y citrato-yema-fructosa-glicerol son los diluyentes a base de Tris y citrato más utilizados para congelar semen bovino. Al incorporar varios tipos de aditivos en los diluyentes de semen para la criopreservación, se reporta una mejora significativa en la calidad del esperma después de la descongelación en términos de porcentaje de la motilidad, viabilidad, y una disminución en la fragmentación del ADN (Raheja *et al.*, 2018).

3.10 Uso de diluyentes de origen vegetal en la criopreservación del semen

En los últimos años, se ha descubierto que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) extraídas de la YH tienen mejores efectos en la protección de los espermatozoides contra el choque por frío en comparación con la YH (Jiang *et al.*, 2007) Sin embargo, algunos investigadores consideraron que esos ingredientes de origen animal podrían presentar riesgos de contaminación microbiana durante el procedimiento de IA en animales domésticos (Vidal *et al.*, 2013; Lima-Verde *et al.*, 2017; Miguel-Jimenez *et al.*, 2020). Como uno de los

fosfolípidos, la lecitina (o fosfatidilclina) se distribuye ampliamente en las plantas y desempeña un papel importante en la regulación de la función fisiológica de la biomembrana de las células animales (Zhang *et al.*, 2009).

Los diluyentes utilizados para la criopreservación del semen protegen al espermatozoide del choque frío, preservando tanto la motilidad como la fertilidad al promover la estabilización de la membrana plasmática y sustratos energéticos. Estos atributos reducen los efectos nocivos de los cambios en el pH y osmolaridad, previenen el crecimiento de bacterias y proteger los espermatozoides del daño causado por la refrigeración, congelación y descongelación (Vidal *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de las buenas tasas de fecundidad observadas cuando utilizando diluyentes que contengan YH y/o leche, estos componentes representan un riesgo de contaminación si los microorganismos, como bacterias y hongos, están presentes en el producto fresco. Lo anterior, puede liberar endotoxinas que reducen la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Vidal *et al.*, 2013; Lima-Verde *et al.*, 2017). En consecuencia, en los últimos años se han probado diluyentes libres de proteína animal. (Lima-verde *et al.*, 2017; Miguel-Jimenez *et al.*, 2020).

Por lo anterior, una alternativa viable para reemplazar los componentes de origen animal en los diluyentes para congelar el semen es la lecitina de soya, un fosfolípido que es el principal componente de la fracción fosfato de la YH y la soya (Vidal *et al.*, 2013; Lima-Verde *et al.*, 2017; Miguel-Jimenez *et al.*, 2020). Además, el uso de liposomas en medios de congelación parece ser también otra alternativa eficaz, los liposomas contienen una composición y concentración óptimas de fosfolípidos que aseguran la protección celular durante la criopreservación y no son un vector de agentes infecciosos. Los fosfolípidos también son eficaces para proteger los espermatozoides durante la criopreservación y, por lo tanto, pueden ser una alternativa prometedora para la YH (Miguel-Jimenez *et al.*, 2020).

Miguel-Jimenez *et al.*, (2020) menciona que Oke *et al.*, (2010) refiere que la lecitina de soya surge como un sustituto de la YH para productos basados de

origen no animal. La lecitina de soya es una mezcla natural de fosfatidilcolina y varios ácidos grasos como el esteárico, oleico y palmítico que confiere estabilidad estructural a las membranas celulares.

Actualmente, el uso de liposomas en medios de congelación parece ser una alternativa eficaz para el desarrollo de diluyentes. Los liposomas contienen una composición y concentración óptimas de fosfolípidos que aseguran la protección celular durante la criopreservación. y no son un vector de agente infeccioso (Manjunath, 2012; Miguel-Jimenez *et al.*, 2020). Resultados de estudios recientes realizados con toros (Lima-Verde *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2018), búfalos (Kumar *et al.*, 2015) y sementales (Pillet *et al.*, 2012) indican liposomas compuestos de los fosfolípidos de la YH también son eficaces para proteger los espermatozoides durante la criopreservación y, por lo tanto, pueden ser una alternativa prometedora para la YH.

IV. LITERATURA CITADA

Akçay, E., Kulaksız, R., Daşkin, A., Çebi, Ç., & Tekin, K. (2012). The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *survival*, 9(10), 11.

Akçay, E., Kulaksız, R., Daşkin, A., Çebi, Ç., & Tekin, K. (2012). The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *survival*, 9(10), 11.

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907.

Andrabi, S. M. H., Ansari, M. S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A., & Akhter, S. (2008). Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 427-433.

Ansari, M. S., Rakha, B. A., & Akhter, S. (2017). Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 992-997.

Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68-73.

Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68-73.

Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk

types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68-73.

Baust, J. M., Snyder, K. K., VanBuskirk, R. G., & Baust, J. G. (2009). Changing paradigms in biopreservation. *Biopreservation and biobanking*, 7(1), 3-12.

El-Sisy, G. A., El-Badry, D. A., El-Sheshtawy, R. I., & El-Nattat, W. S. (2018). Effects of Phoenix dactylifera pollen grains extract supplementation on post-thaw quality of Arabian stallion semen. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(1).

Gamal, A., El-Maaty, A. M. A., & Rawash, Z. M. (2016). Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(5), 428-433.

García V, W., Alarcón B, V., & Bravo M, P. W. (2017). Artificial insemination of alpacas with refrigerated semen and the inclusion of two types of egg yolk. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 28(2), 337-344.

Javed, M., Tunio, M. T., Abdul Rauf, H., Bhutta, M. F., Naz, S., & Iqbal, S. (2019). Addition of pomegranate juice (*Punica granatum*) in tris-based extender improves post-thaw quality, motion dynamics and in vivo fertility of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*, 51(8), e13322.

Khaliq, k., Ahmad, N., Sattar, A., Shehzad, W., Hussain, M., & Andrabi, S. I. (2017). Comparison of the cryoprotective effect of quail and chicken egg yolk on the freezability of nili-ravi buffalo bull spermatozoa. *Wayamba Journal of Animal Science* 1541 -1548, 2017.

Kulaksız, R., Çebi, Ç., Akçay, E., & Daşkın, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research*, 88(1), 12-15.

Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1-9.

Lima-Verde, I. B., Johannisson, A., Ntallaris, T., Al-Essawe, E., Al-Kass, Z., Nongbua, T., ... & 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.

Miguel-Jimenez, S., Del Alamo, M. M. R., Álvarez-Rodríguez, M., Hidalgo, C. O., Peña, A. I., Muiño, R., ... & Mogas, T. (2020). In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin-and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal reproduction science*, 215, 106315.

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.

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.

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.

Ramírez-Vasquez, R. R., Cano, A., Hozbor, F. A., & Cesari, A. (2019). Cryopreservation and egg yolk extender components modify the interaction between seminal plasma proteins and the sperm surface. *Theriogenology*, 140, 153-163.

Salomon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 77-111.

Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal reproduction science*, 169, 2-5.

Singh, M. A. H. A. K., Ramteke, S. S., Ghosh, S. K., Prasad, J. K., & Rajoriya, J. (2013). Efficacy of egg yolk from three avian species on semen freezability of Tharparkar bull. *Indian J. Anim. Reprod*, *34*(2), 25-28.

Swelum, A. A. A., Saadeldin, I. M., Alanazi, M. B., Ba-Awadh, H., Afifi, M., & Alowaimer, A. N. (2018). Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen. *Animal reproduction science*, *195*, 345-354.

Tabarez, A., García, W., & Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, *149*, 91-98.

Tekin, H., Bilkay, O., Ataberk, S. S., Balta, T. H., Ceribasi, I. H., Sanin, F. D., ... & Yetis, U. (2006). Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. *Journal of hazardous materials*, *136*(2), 258-265.

Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., & Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, *34*(4), 385-393.

Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., ... & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, *6*, 268..

Vidal, A. H., Batista, A. M., da Silva, E. C. B., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2013). Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, *109*(1), 47-51.

Vidal, A. H., Batista, A. M., da Silva, E. C. B., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2013). Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, *109*(1), 47-51.

Waheed, S., Ahmad, N., Jamil-ur-Rahman, H., Younis, M., & Iqbal, S. (2012). Evaluation of duck egg yolk for the cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Animal reproduction science*, 131(1-2), 95-99.

Wang, Y. X., You, L., Zeng, Q., Sun, Y., Huang, Y. H., Wang, C., ... & Lu, W. Q. (2015). Phthalate exposure and human semen quality: Results from an infertility clinic in China. *Environmental research*, 142, 1-9.

Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z., & Zhang, X. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).

Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z., & Zhang, X. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).

V. ARTÍCULOS

ABANICO VETERINARIO ISSN 2448-6132 abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-veterinario

Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 11:1-12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.8>
 Artículo Original. Recibido: 31/08/2020. Aceptado: 20/01/2021. Publicado: 06/02/2021. Clave:2020-75.

Determinación de la calidad del semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo, en machos cabríos

Determination of the quality of semen cryopreserved with soy lecithin or egg yolk, in male goats

Moreno-Avalos Silvestre¹ ID, Veliz-Deras Francisco² ID, Calderon-Leyva Guadalupe¹ ID, Contreras-Villarreal Viridiana² ID, Guillen-Muñoz Juan² ID, Angel-García Oscar² ID

¹Departamento de Producción Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila, México. ²Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila, México. *Autor responsable y de correspondencia: Ángel-García Oscar. Periférico y Carretera a Santa Fé SN, Colonia Valle Verde, Torreón, Coahuila, México, CP 27052. Correo. angelgarciao@hotmail.com, velizderas@gmail.com, gcalderon06@hotmail.com, dra.viridianac@gmail.com, mvz_guillen@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo fue comparar la calidad del semen caprino criopreservado con diferentes tratamientos a base de lecitina de soya o yema de huevo. El semen fue colectado de machos cabríos Alpinos (n=4), se utilizaron dos diluyentes comerciales: AndroMed® (1% de lecitina de soya, LS); Optidyl® con 20% (v/v) de Tris-yema de huevo; TY), y un tercer diluyente a base de citrato-yema de huevo (CY), en semen fresco (SF) y después fue enfriado de 37 a 4 °C durante 2 h; semen refrigerado (SR), posteriormente se llenaron pajillas con semen y se congelaron en nitrógeno líquido a -196 °C (SC). No existieron diferencias (p>0.05) entre diluyentes en el SF respecto a motilidad masal (MM; 4.7±0.26), viabilidad espermática (VE; 74.1±1.66) y motilidad individual (MI; 62.3±4.0). En el mismo sentido, para el SR no existió diferencia (p>0.05) entre diluyentes respecto a MM=3.83±0.4, y MI= 52.1±6.0, sin embargo, la VE varió (p<0.05) de acuerdo al diluyente, observando la menor viabilidad en LS vs. CY y TY (51.0±13.0 vs 71.3±3.0 y 69.0±3.1). Respecto al SC, la MM, MI y VE favorecieron (p<0.05) al diluyente TY vs. LS y CY (2.4±0.5, 32.5±8.3, 41.3±13.0). Los resultados mostraron una mejor crio-preservación del semen caprino con el diluyente Tris-yema respecto al de lecitina de soya.

Palabras clave: Lecitina de soya, diluyente, semen caprino

ABSTRACT

The objective was to compare the quality of cryopreserved goat semen with soy lecithin or egg yolk. The semen was collected from male goats (n=4), two commercial diluents AndroMed® (1% soy lecithin, LS); Optidyl® (20% (v/v) Tris-egg yolk; TY), and a citrate-egg yolk-based diluent (CY) were used in fresh semen (SF) and then cooled from 37 to 4 °C for 2 h (refrigerated semen, SR), afterwards straws were filled with semen and frozen in liquid nitrogen at -196 °C (SC). There were no differences (p>0.05) between diluents in the SF in the mass motility (MM; 4.7±0.26), sperm viability (VE; 74.1±1.66) and individual motility (MI; 62.3±4.0). In the same sense, for the SR there was no difference (p>0.05) between diluents with respect to MM (3.83±0.4) and MI (52.1±6.0), however, the VE varied (p<0.05) according to the diluent, observing the lowest viability in LS vs CY and TY (51.0±13.0 vs 71.3±3.0 and 69.0±3.1). Regarding SC the MM, MI and VE obtained better values (p<0.05) with the diluent TY vs LS and CY (2.4±0.5, 32.5±8.3, 41.3±13.0). The results showed a better cryopreservation of goat semen with the diluent Tris-yolk compared to that of soy lecithin.

Keywords: Soy lecithin, diluent, goat semen

INTRODUCCIÓN

Los diluyentes tradicionales que son agregados al semen para la preservación de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante la crioconservación incluyen yema de huevo (Lima-Verde *et al.*, 2017); lo anterior, debido a que la yema de huevo protege al espermatozoide de los daños inducidos por la crioconservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación al interactuar directamente con la membrana plasmática (Andrabi *et al.*, 2008; Akçay *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2016). Sin embargo, en los últimos años, frecuentemente se ha opinado en contra del uso de la yema de huevo debido a la gran variabilidad de sus componentes, lo que hace que la evaluación de sus beneficios sea compleja (Kulaksız *et al.*, 2010); además se ha tratado de evitar el uso de diluyentes de origen animal, ya que podrían ser una posible ruta de transmisión de enfermedades (Lima-Verde *et al.*, 2017; Ansari *et al.*, 2017).

En lo que se refiere a la yema de huevo, algunos componentes indeseables (hormonas esteroides y sus moléculas precursoras) se consideran perjudiciales para la integridad del espermatozoide (Akhter *et al.*, 2012; Lima-Verde *et al.*, 2017). El componente principal de la yema de huevo que protege a la membrana espermática es la lipoproteína de baja densidad (LDL). Se ha demostrado que los fosfolípidos o lecitina de la yema de huevo hace a los espermatozoides menos sensibles al enfriamiento (Zeron *et al.*, 2002). De manera particular, en el macho cabrío, existen interacciones negativas entre los fosfolípidos de la yema de huevo y la glándula bulbouretral, esta glándula secreta con el plasma seminal una enzima coagulante de la yema de huevo, la cual cataliza la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo en ácidos grasos y lisolectina, que son citotóxicos (Ngoma *et al.*, 2016). Por lo anterior, se han utilizado sustitutos de la yema de huevo químicamente definidos sin ser de origen animal (El-Sisy *et al.*, 2018; Gamal *et al.*, 2016), elaborados a base de lecitina de soya y que pueden ser alternativas potenciales para la criopreservación del semen (Akhter *et al.*, 2012).

Se cree que los liposomas actúan de manera similar a las lecitinas de la yema de huevo o la leche (Belala *et al.*, 2016). En el búfalo de agua, no se encontraron diferencias en términos de integridad acrosomal cuando se utilizaron diluyentes a base de yema de huevo, lecitina o liposomas de soya (Kumar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013). En este contexto, merecen atención especial los diluyentes elaborados en base a yema de huevo en cuanto a sus componentes y su efecto en comparación con los diluyentes basados en liposomas. Debido a que el efecto de los componentes mencionados anteriormente es poco conocido sobre la calidad del semen crioconservado en el macho cabrío, nos planteamos el objetivo de comparar los efectos de diluyentes a base de lecitina de soya o yema de huevo sobre la calidad del semen, conservado por refrigeración y congelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

General

Todos los métodos y manejo de las unidades experimentales utilizadas en este estudio fueron en estricto acuerdo con los lineamientos para el uso ético, cuidado y bienestar de animales en investigación a nivel internacional (FASS, 2010) y nivel nacional (NAM, 2002) con número de referencia de aprobación institucional UAAAN-UL con clave 38111-425501002-2431.

Localización y animales

El experimento se realizó en el norte de México, en el Centro Caprino de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (26° de Latitud Norte y 104° de Longitud Oeste), durante la época reproductiva (enero). El área de estudio se encuentra a una altitud 1120 msnm, con una precipitación media anual de 230 mm y con temperatura promedio de 24 °C, máxima de 41 °C en mayo y junio, y mínima de -1 °C en diciembre y enero (CONAGUA, 2015). Se utilizaron machos cabrios adultos de la raza Alpino-francés (n = 4, de 1.5 a 2 años de edad), homogéneos en cuanto a peso vivo (PV; 75.0 ± 0.32 kg) y condición corporal (CC; 3.5 ± 0.10 unidades); con fertilidad probada previo al estudio experimental a través de evaluaciones frecuentes de calidad seminal. Durante el periodo experimental, los machos se alimentaron dos veces al día (800 h y 1800 h), a libre acceso con una dieta basada en heno de alfalfa (18% PC, 1.95 Mcal de EM) y 100 g de concentrado comercial (21% PC, 1.7 Mcal EM) en base a sus requerimientos nutricionales (NRC, 2007). Los machos tuvieron libre acceso al agua limpia y sales minerales y un periodo de adaptación de 2 semanas previas a la investigación.

Colección y procesamiento del semen

El semen fue colectado por la mañana (800 a 1000 h) cada 3 d, durante tres semanas, se usó como estímulo para la extracción de semen una hembra en actividad estral. El semen fue recolectado con una vagina artificial estándar para ovinos y caprinos, mantenida a una temperatura de 38 °C, por lo que se precalentó a 42 °C previo a la recolección. Se colectaron un total de 24 eyaculados, después de cada extracción el semen fue sumergido inmediatamente en baño maría a 37 °C para su posterior análisis macroscópico y microscópico durante los siguientes 10 minutos.

Preparación de diluyentes y proceso de congelado

De un total de 24 eyaculados (6 eyaculados por macho) y cada eyaculado se dividió en tres alícuotas en partes iguales para ser procesado para la criopreservación, utilizando dos diluyentes comerciales: AndroMed® (Minitübe, Tiefenbach, Alemania; con 1% de lecitina de soya; **LS**); Optidyl® (CRYO-VET, Francia; con 20% (v/v) de Tris-yema de huevo; **TY**), y un tercer diluyente a base de citrato-yema de huevo fresco (**CY**) obtenido de acuerdo a la técnica utilizada por Salamon y Maxwell, (2000).

En el experimento fueron consideradas únicamente muestras con un volumen > 0.5 mL, una concentración de 2.5×10^9 mL, motilidad masal ≥ 3.0 y viabilidad $\geq 70\%$. Posteriormente las muestras ya diluidas fueron sometidas a 3 procesos para su evaluación: semen fresco (SF); semen refrigerado (SR, equilibrado a 4°C por 2 horas); y semen congelado (SC). Después de refrigerar el semen se llenaron las pajillas de 0.25 mL y para el proceso de congelación se colocaron a 7 cm de nitrógeno líquido (NL, -140°C) por 10 min; después se sumergieron directamente en el NL (-196°C) y se almacenaron hasta su análisis (Jerez *et al.*, 2016). En cada uno de los estados de conservación (SF, SR y SC), el semen se analizó, inmediatamente y cada 15 minutos durante el proceso de conservación, para evaluar la motilidad masal e individual y la viabilidad. En el caso del SC, éste se analizó 24 horas después, para lo cual, la pajilla se descongeló, sumergiéndola en agua atemperada (37°C) durante 30 s.

Variables evaluadas

La *motilidad masal* (MM; %), se evaluó con el uso de una plataforma precalentada (37°C), colocando una gota de semen puro (20 μl) sobre una lámina portaobjetos en el microscopio óptico con objetivo de 10x, y de acuerdo con el movimiento observado se asignó un puntaje de escala arbitraria de 1 a 5, donde 1 = 25% y 5 = 100% de espermatozoides móviles (Mahsud *et al.*, 2013). La *motilidad individual* (MI; %), se determinó en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles, para ello, se colocó una gota (10 μL) de semen sobre una lámina portaobjetos y fue cubierta con una laminilla cubreobjetos; posteriormente se observó al microscopio con objetivo de 40x. La *viabilidad espermática* (VE; %), se evaluó mediante el uso de la técnica de tinción con eosina-nigrosina (Kafi *et al.*, 2004), se observaron al menos 200 espermatozoides por muestra mediante microscopio óptico, utilizando el objetivo de 100X, y se calculó el porcentaje de células vivas (sin teñir) y de células muertas (teñidas de color rosa). Todas las evaluaciones fueron realizadas siempre por el mismo evaluador calificado.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA usando el procedimiento Modelo Lineal General (GLM). Las medias obtenidas de los parámetros seminales fueron comparadas usando una prueba de *t*. Se contempló el efecto del uso de los diferentes diluyentes, los estados del proceso de crioconservación y la interacción de estos. Todos los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS V9.1 (SAS, 2005). Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los diferentes parámetros evaluados para determinar la calidad del semen diluido con LS, TY o CY, en semen fresco (SF), refrigerado durante 2 h (SR) y semen congelado (SC) se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Medias (\pm EE) para la calidad del semen criopreservado de machos cabríos Alpinos-franceses diluido con lecitina de soja o yema de huevo

Parámetros	MM (escala,1-5)	MI (%)	VE (%)
Semen Fresco			
LS	4.6 \pm 0.2 ^a	63.0 \pm 1.2 ^a	76.0 \pm 2.0 ^a
TY	4.8 \pm 0.3 ^a	62.5 \pm 1.4 ^a	75.0 \pm 0.0 ^a
CY	4.8 \pm 0.3 ^a	61.3 \pm 4.3 ^a	71.3 \pm 4.0 ^a
Semen Refrigerado			
LS	3.1 \pm 1.0 ^a	44.0 \pm 12.0 ^{ab}	51.0 \pm 13.0 ^{bc}
TY	4.4 \pm 0.1 ^a	57.5 \pm 2.5 ^a	71.3 \pm 2.4 ^a
CY	4.0 \pm 0.2 ^a	55.0 \pm 3.5 ^a	69.0 \pm 3.1 ^{ab}
Semen Congelado			
LS	1.0 \pm 0.4 ^c	11.0 \pm 6.4 ^c	11.0 \pm 7.1 ^d
TY	2.4 \pm 0.5 ^b	32.5 \pm 8.3 ^b	41.3 \pm 13.0 ^c
CY	0.5 \pm 0.3 ^c	6.3 \pm 3.8 ^c	2.5 \pm 2.5 ^d

Tratamientos: Andromed® (**LS**; 1% de lecitina de soja), Optidyl® (**TY**; Tris- 20% de yema de huevo) o citrato- yema de huevo (**CY**). Motilidad masal (**MM**; escala, 1-5), Motilidad individual (**MI**; %), Viabilidad espermática (**VE**; %). ^{abcd} Superíndices desiguales entre filas indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

En el SF, se obtuvieron valores similares entre los grupos ($P > 0.05$) en cada una de las variables evaluadas [MM (4.7 \pm 0.26 %), VE (74.1 \pm 1.66 %) y MI (62.3 \pm 4.0 %)]. Los resultados sugieren que la composición de los diluyentes utilizados en este estudio afecta la calidad de los espermatozoides posterior al proceso de descongelamiento. Sin embargo, la calidad seminal post descongelación se vio más afectada cuando se utilizó el diluyente a base LS, en comparación con el TY. Estos resultados son similares a los reportados en equinos y cérvidos; en los cuales se muestra una mayor calidad seminal cuando se utilizan diluyentes a base de yema de huevo (Pillet *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2018). Es probable que los resultados encontrados se deban a que el componente Tris-yema de huevo ayuda a disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) manteniendo así el potencial de integridad de la membrana al reducir el choque térmico causado por los cambios de temperatura en el proceso de criopreservación (Alcay *et al.*, 2016; Seifi-Jamadi *et al.*, 2017). Lo anterior puede estar relacionado con el componente efectivo de la yema de huevo que es la lipoproteína de baja densidad (20%), que contiene

el TY y funciona como fracción crioprotectora que ayuda a mantener el semen de mejor calidad (Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010; Alcay *et al.*, 2016).

Al comparar los efectos de los diluyentes en las condiciones de SR, no existieron diferencias ($P>0.05$) en la MM y MI (3.83 ± 0.4 % y 52.1 ± 6.0 %, respectivamente); sin embargo, el porcentaje de VE fue más bajo con el diluyente a base de LS comparado con el TY y CY (51.0 ± 13.0 vs 71.3 ± 3.0 y 69.0 ± 3.1 respectivamente; $P<0.05$).

Los resultados reportados en el presente experimento referentes al diluyente TY concuerdan con lo reportado por Celeghini *et al.* (2008), que indican una mayor integridad del acrosoma de espermatozoides de toro, y Konyak *et al.* (2018) quienes encontraron que después del equilibrio y la congelación del semen de machos cabríos, la motilidad espermática es significativamente mayor al utilizar el diluyente Tris con 20% de yema de huevo, respecto al conformado por 1% de lecitina de soya. Al respecto, se ha comprobado que la lecitina de soya no es capaz de evitar la peroxidación lipídica que ocurre durante el proceso de enfriamiento del espermatozoide (Salmani *et al.*, 2013).

Previas investigaciones en ovinos han demostrado que el semen diluido con lecitina de soya presenta daño en la membrana espermática, y en consecuencia daño a nivel mitocondrial, lo que resulta en una menor movilidad y fertilidad de los espermatozoides (Del Valle *et al.*, 2012; Lima-Verde *et al.*, 2017). Konyak *et al.* (2018) atribuye la baja en la calidad espermática del semen expuesto a la LS a diferencias en la concentración de la lecitina de soya utilizada, en relación a esto, Forouzanfar *et al.* (2010) observaron en semen de carneros que los diluyentes que contenían concentraciones de 1% de lecitina presentaban mayor viabilidad espermática, comparado con los de 2% de lecitina, y además que el rango 1 a 1.5% de lecitina de soya en el diluyente mostraron mejores características del semen después de la preservación.

En el SC, los valores de MM, MI y VE fueron superiores en el semen diluido con TY (2.4 ± 0.5 , 32.5 ± 8.3 , 41.3 ± 13.0 , respectivamente; $P\leq 0.05$) en comparación con el semen diluido con LS y el CY que disminuyeron su MM, MI y VE drásticamente (1.0 ± 0.4 , 11.0 ± 6.4 , 11.0 ± 7.1 y 0.5 ± 0.3 , 6.3 ± 3.8 y 2.5 ± 2.5 respectivamente; $P\leq 0.05$). De igual forma los resultados en nuestro estudio en el CY post-descongelación fue inferiores en comparación con el TY. Es probable que estos resultados estén asociados a los componentes del diluyente, específicamente al porcentaje de yema de huevo, en el diluyente CY fue a una concentración del 15%, y en el TY al 20%. Estos resultados concuerdan con Fourouzanfar *et al.* (2010), quienes reportan que la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación son superiores cuando se utiliza una concentración de yema de huevo al 20% que cuando se utiliza al 15%. Del mismo modo, otros trabajos confirman que el aumento en la concentración de la yema de huevo mejora la preservación de la calidad espermática (Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010; Alcay *et al.*, 2016). La razón de este mejoramiento puede ser debido a que los fosfolípidos que contiene la yema de huevo como la fosfatidilcolina, son importantes para el

mantenimiento de la integridad de la membrana espermática durante el proceso de congelación y post-descongelación (Mousa *et al.*, 2002; Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010; Alcay *et al.*, 2016). Por lo que es probable que un alto porcentaje de yema de huevo mejore la viabilidad espermática observada en el TY, y ésta contribuyera a mantener los niveles de ácidos grasos polinsaturados necesarios para la membrana de los espermatozoides, siendo menos susceptibles a la peroxidación lipídica destructiva (Cerolini *et al.*, 2001; Kaeoket *et al.*, 2010).

Por otra parte, la mala calidad seminal post-descongelación del CY, pudo deberse a que la yema de huevo tiene alto riesgo de sufrir una contaminación microbiana, lo cual pudo disminuir la calidad seminal, post-descongelación (Aboagla *et al.*, 2004; Kulakzis *et al.*, 2010); y al ser la yema de huevo comercial (CY), pudo no tener una buena calidad sanitaria, lo que perjudicó la calidad seminal post-congelación. Otro factor que pudo afectar la calidad del semen del CY, es la dieta y el manejo de las aves productoras (Lima-Verde *et al.*, 2017). En efecto, varios estudios han mostrado que las yemas de huevo de diferentes especies de aves muestran una variación en sus componentes, lo que resulta en diferentes efectos en el proceso de criopreservación sobre los espermatozoides (Trimeche *et al.*, 1997; Bathgate *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2013). Además, la yema de huevo puede contener metabolitos dañinos y endotoxinas que afectan la viabilidad de los espermatozoides (Vidal *et al.*, 2013), así como hormonas esteroides que reducen la motilidad espermática (El-Sisy *et al.*, 2018). Previos estudios de laboratorio revelan que, mediante eliminación de algunos componentes en la yema de huevo por centrifugación; además de ciertas sustancias en la yema que inhiben la respiración y la motilidad espermática, sugiriendo el reemplazo la yema de huevo entera por la fracción crioprotectora (Amirat *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio no mostraron diferencias estadísticas significativas entre el uso de los diferentes diluyentes para la conservación del SF y SR; sin embargo, el Tris-yema de huevo obtuvo una mayor motilidad masal e individual y viabilidad post-descongelación en comparación con el diluyente a base de lecitina de soya durante el proceso de crioconservación del semen de machos cabríos Alpinos

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado a la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SADER-CONACYT, México) por el apoyo financiero otorgado a través del Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos, 2017-04-291691.

LITERATURA CITADA

- ABOAGLA EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(6):1160-1172. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>
- AKÇAY E Kulaksız R, Daşkin A, Çebi Ç, Tekin K. 2012. The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *Slovenian Veterinary Research*. 49 (2):97-102. ISSN: 1580-4003. https://www.academia.edu/24162140/The_Effect_of_Different_Dilution_Rates_on_Post_Thaw_Quality_of_Ram_Semen_Frozen_in_Two_Different_Egg_yolk_Free_Extenders
- AKHTER S, Ansari MS, Andrabi SMH, Rakha BA, Ullah N, Khalid M. 2012. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(5):815-819. ISSN: 1439-0531.x <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x>
- ALCAY S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabacı E, Cavus S. 2016. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*. 72(3): 269-273. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.007>
- AMIRAT L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61(5): 895-907. ISSN: 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)
- ANDRABI SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4): 427-433. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.003>
- ANSARI MS, Rakha BA, Akhter S. 2017. Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*. 52(6):992-997. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13008>
- BATHGATE R, Maxwell WMC, Evans G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(1):68-73. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x>

BELALA R, Briand-Amirat L, Vinciguerra L, Tainturier D, Kaidi R, Thorin C, Bencharif D. 2016. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Research in Veterinary Science*. 106: 66-73. ISSN:0034-5288. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.010>

CELEGHINI ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4):119-131. ISSN:0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.001>

CEROLINI S, Maldjian, A, Pizzi F, Gliozzi T. M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121(3):395-401. ISSN: 1741-7899. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210395>

CONAGUA. 2015. Normales climatológicas por estación. *Ciudad de México: Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del Agua*. <https://smn.conagua.gob.mx/es/>

DEL VALLE I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2012. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33(4):717-725. ISSN: 1939-4640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014944>

EL-SISY GA, El-Badry DA, El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS. 2018. Effects of Phoenix dactylifera pollen grains extract supplementation on post-thaw quality of Arabian stallion semen. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 21(1):40-49. ISSN: 1.311-1477. <https://doi.org/10.15547/bjvm.1044>

FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching, 3rd ed. Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA. ISBN: 978-956-14-2161-5.

<https://books.google.com.mx/books?id=EA1QDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Guide+for+the+Care+and+Use+of+Agricultural+Animals+in+Agricultural+Research+and+Teaching&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewi8svistjrAhUIW60KHUttBHMq6AEwAnoECAUQAg#v=onepage&q=Guide%20for%20the%20Care%20and%20Use%20of%20Agricultural%20Animals%20in%20Agricultural%20Research%20and%20Teaching&f=false>

FOROUZANFAR M, Sharafi M, Hosseini S M, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Nasr-Esfahani MH. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73(4):480-487. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>

- GAMAL A, El-Maaty AMA, Rawash ZM. 2016. Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5(5):428-433. ISSN: 2305-0500. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.006>
- JEREZ R, González N, Olaciregui M, Luño V, de Blas I, Gil L. 2016. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 134:34-38. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.003>
- KAEOKET K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M. 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology*. 12(5):760. <https://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.48>
- KAFI M, Safdarian M, Hashemi M. 2004. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference, and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*. 53(1-2):133-139. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.07.007>
- KONYAK P, Mandal A, Mondal M, Bhakat C, Das SK, Rai S, Karunakaran M. 2018. Preservation of black Bengal buck semen in soybean lecithin based chemically defined extender. *Indian Journal of Animal Research*. 52(8):1151-1154. ISSN: 0976-0555. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3335>
- KULAKSIZ R, Çebi Ç, Akçay E, Daşkın A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*. 88(1):12-15. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014>
- KUMAR P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, Yadav PS. 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*. 159:38-45. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010>
- LIMA-VERDE IB, Johannisson A, Ntallaris T, Al-Essawe E, Al-Kass Z, Nongbua T, Morrell, JM. 2017. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 53(1): 127-136. ISSN: 1439-0531 <https://doi.org/10.1111/rda.13080>
- MAHSUD T, Jamil H, Qureshi ZI, Asi MN, Lodhi LA, Waqas MS, Ahmad A. 2013. Semen quality parameters and selected bio-chemical constituents level in plasma of Lohi rams. *Small Ruminant Research*. 113(1): 175-178. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.04.004>

- MOUSSA M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57(6):1695-1706. ISSN: 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9)
- NAM. 2002. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Co-produced by the National Academy of Medicine-Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 1st ed. Harlan Mexico, DF, Mexico. ISBN: 978-0-309-15400-0. <https://books.google.com.mx/books?id=GyxkAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Guide+for+the+Care+and+Use+of+Laboratory+Animals.+ISBN&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjr1pGOtNjrAhUEPq0KHRA3AU0Q6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=Guide%20for%20the%20Care%20and%20Use%20of%20Laboratory%20Animals.%20ISBN&f=false>
- NGOMA L, Kambulu L, Mwanza M. 2016. Factors Influencing goat's semen fertility and storage: A Literature Review. *Journal of Human Ecology*. 56(1-2):114-125. ISSN: 2456-6608. <https://doi.org/10.1080/09709274.2016.11907045>
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. National Research Council, National Academies Press, Washington, USA. ISBN: 978-0-309-47323-1. <https://www.nap.edu/catalog/11654/nutrient-requirements-of-small-ruminants-sheep-goats-cervids-and-new>
- PILLET E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Magistrini M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*. 77(2):268-279. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.001>
- SALAMON S, Maxwell W MC. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3):77-111. ISSN: 0378-4320. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- SALMANI H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Zhandi M. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*. 112(1-3):123-127. ISSN:0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.015>
- SAS (Statistical Analysis System) 2005. *Statistical Analysis Software SAS/STAT*® version 9.1, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc.
- SEIFI-JAMADI A, Ahmad E, Ansari M, Kohram, H. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*. 75:15-20. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.03.002>

SIEME H, Oldenhof H, Wolkers WF. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169:2-5. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>

SINGH MAHAK, Ramteke SS, Ghosh SK, Prasad JK, Rajoriya JS. 2013. Efficacy of egg yolk from three avian species on semen freezability of Tharparkar bull. *Indian Journal Animals Reproduction*. 34(2):25-28. ISSN: 0970 – 2997. https://scholar.google.com/citations?user=ot596g4AAAAJ&hl=en#d=gs_md_cita-d&u=%2Fcitations%3Fview_op%3Dview_citation%26hl%3Den%26user%3Dot596g4AAAJ%26citation_for_view%3Dot596g4AAAAJ%3AWF5omc3nYNoC%26tzm%3D300

STEWART JL, Shipley CF, Ellerbrock RE, Schmidt L, Lima FS, Canisso IF. 2018. Physiological variations in reproductive and metabolic features of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) bucks throughout the rutting season. *Theriogenology*. 114(1):308-316. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.015>

TRIMECHE A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*. 34(4):385-393. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2009>

VIDAL AH, Batista AM, da Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 109(1):47-51. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>

ZERON Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. 2002. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*. 45(2):143-152. ISSN: 0011-2240. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00123-2)

Efficiency of quail egg yolk upon French Alpine goat semen cryopreservation

S. Moreno-Avalos¹, O. Angel-Garcia², F. Arellano-Rodríguez³, D. I. Carrillo-Moreno³,
L. R. Gaytán-Alemán⁴, G. Calderón-Leyva³, V. Contreras-Villarreal², F.G. Véliz-Deras^{2*}

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Periférico Raúl López Sánchez s/n, Colonia Valle Verde, Torreón, Coahuila, México.

¹Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México. ²Departamento de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México.

³Departamento de Producción Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México. ⁴Departamento de Salubridad e higiene, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México.

ABSTRACT

Background: The chicken egg yolk has been used to preserve viability and fertility of spermatozoa during cryopreservation, however, the egg yolk of other species (such as quail) has been shown to have different components, which can result in different effects in the cryopreservation process on sperm. In the present study, the effect of chicken or quail egg yolk and a commercial diluent (Optidyl®) on the quality of goat sperm after freezing and thawing was evaluated. **Methods:** During the breeding season, semen was collected (n=3 adult French alpine male goats) every third day, a total of 12 ejaculates, divided into 3 equal parts and diluted with quail or chicken egg yolk or a commercial diluent were used. After dilution, they were divided and subjected to 3 evaluation stages, fresh; cooled; and frozen. **Result:** The inclusion of 15% of quail or chicken egg yolk had no effect upon the quality parameters of male goat semen post-thawing when compared to a commercial diluent.

Key Words: Diluent, male goat, semen, quail egg yolk

INTRODUCTION

* Corresponding Author: F.G. Véliz-Deras, Departamento de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México. Email: velizderas@gmail.com

37 Semen cryopreservation has been used as a routinary technique for semen
38 processing for artificial insemination (AI) (Singh *et al.* 2013). During cryopreservation,
39 either egg yolk or milk is added to semen to preserve viability and fertility of the
40 spermatozoa (Lima-Verde *et al.* 2018). Currently, egg yolk is a very common component
41 in most semen diluents for domestic animals as bulls, rams, and bucks (Moussa *et al.*
42 2002), it has been proved that egg yolk is able to protect the plasma membrane and
43 acrosome of sperm against temperature-related injuries in association with other
44 components (Kulaksiz *et al.* 2010).

45 The active component of egg yolk in semen diluents is low-density lipoprotein,
46 which functions as a cryoprotective fraction against cold shock (resistance factor) helping
47 to maintain seminal quality (preservative factor) (Forouzanfar *et al.* 2010), and avoiding
48 induced damage to the membrane integrity during the cryopreservation process (Sieme *et*
49 *al.* 2016).

50 Traditionally, chicken (*Gallus domesticus*) egg yolk has been used to preserve
51 viability and fertility of spermatozoa during cryopreservation (Akçay *et al.* 2012; Sieme
52 *et al.* 2016). However, several studies have shown that the egg yolk of other species (such
53 as quail) have different components of fatty acids, phospholipids, and cholesterol, which
54 can result in different effects in the cryopreservation process on sperm (Trimeche *et al.*
55 1997; Bathgate *et al.* 2006; Singh *et al.* 2013). Likewise, results found by Singh *et al.*
56 (2013), show highly significant differences in bull spermatozoid motility characteristics
57 post-freezing in diluents supplemented with 20% of quail egg yolk and compared to
58 diluents that had 20% of either chicken or duck egg yolk. In this regard, it has been
59 reported that differences in post-thaw motility and acrosome integrity of sperm when
60 frozen in media containing different types of egg yolk may be due to variation in
61 composition (Bathgate *et al.* 2006).

62 Despite the importance of using a diluent that allows better results in the
63 cryopreservation of sperm in goat semen, few studies compare the effects of quail egg
64 yolk used as a diluent for cryopreservation of semen from male goats. Therefore, the aim
65 of this study was to evaluate the effect of the egg yolk of two different bird species
66 (chicken and quail) and a commercial diluent (Optidyl®) upon goat sperm quality after
67 freezing and thawing.

68

69

MATERIALS AND METHODS

70 Location and animals

71 The experiment was performed during the reproductive season (august) of 2019,
72 in northern Mexico (26°N, 104°W). The study site is located at an altitude of 1120
73 MAMSL, with a mean annual rainfall and temperature of 230 mm and 24°C, respectively.
74 The highest temperature reaches 41°C in May and June and the lowest is -1°C in December
75 and January.

76 For semen collection, three adult (1 to 1.5 years of age) French alpine male goats
77 homogeneous regarding live weight (LW; 75.0 ± 0.32 kg) and body condition score (BCS;
78 3.5 ± 0.10 units), with proven fertility were used; the experiment took place at the caprine
79 center of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University, where the males were
80 tested for fertility through a series of continuous seminal analysis previous to the study.
81 During the experimental period, the bucks were kept under natural lighting and were feed
82 twice daily (0800 h and 1800 h) with a diet based on alfalfa hay (10% CP) and 100 g of a
83 commercial concentrate (21% CP) according to their nutritional requirements, and with
84 water and mineral salts *ad libitum*.

85 Semen collection and processing

86 Semen was collected in the morning (0800 to 1000 h) every third day, and a female
87 goat in estrus was used as a stimulus. A total of 12 ejaculates were used. For the semen
88 collection, a standard caprine artificial vagina was used, it was kept at a temperature of
89 38°C, for which it was preheated at 42°C before collection, immediately after each
90 extraction, the semen was submerged in a water bath at 37°C for further analysis during
91 the next 10 minutes.

92 Diluent preparation and freezing process

93 For the cryopreservation process, three diluents were used, two of them were based
94 on citrate-quail (QEY) or chicken (CEY) egg yolk prepared from fresh eggs as follows:
95 the eggs were manually broken, carefully separating the yolk using absorbent filter paper
96 to eliminate any trace of albumin that could adhere to the vitelline membrane. This
97 membrane was punctured with a syringe needle and 15 mL of yolk were collected and
98 placed in a beaker. Afterward, 2.37 g of sodium citrate, 0.5 g of glucose, 7 mL of glycerol,

99 100 000 IU of penicillin, and 100 mg of streptomycin were added in 100 mL of distilled
100 water (Salamon and Maxwell, 2000). The third diluent was Optidyl, based in Tris and
101 20% egg yolk (OP; Optidyl®, CRYO-VET, France), and was prepared according to the
102 manufacturer's recommendations.

103 Each one of the ejaculates was divided into 3 equal parts and each part was diluted
104 with one of the three diluents (QEY, CEY, and OP). For the experiment, only the samples
105 that had a volume of ≥ 0.5 ml, a 2.5×10^9 ml concentration, ≥ 3.0 of mass motility, and \geq
106 70% of viability were considered. After dilution, the semen samples were divided and
107 subjected to 3 evaluation stages, fresh semen (FS); cooled semen (CS), cooled from 37 to
108 4°C for 3 hours; and frozen semen (FZS). After cooling the semen, 0.25 mL straws (IMV,
109 France) were filled and sealed with polyvinyl alcohol in a concentration of 80×10^6
110 spermatozooids/mL. The straws were equilibrated to 4°C for 3 h in the refrigerator and, for
111 the freezing process, they were placed in at 4 cm of liquid nitrogen (LN) vapors (-140°C)
112 for 10 min; afterward, the straws were completely submerged in the LN (-196°C) and
113 stored until their analysis (Jerez *et al.* 2016).

114 **Evaluated variables**

115 The semen samples were evaluated in order to obtain the following seminal quality
116 parameters: mass motility (MM, 1-5), which was evaluated with the use of an arbitrary
117 scale of 1 to 5 were 1=20% and 5=100% of motile spermatozooids; it was determined with
118 the use of a preheated (37°C) platform, placing a drop of pure semen (20 μ l) on a slide in
119 the optical microscope with a 10 \times objective. The sperm viability and morphology (SV and
120 MP, %) were evaluated by the use of the eosin-nigrosine staining (Kafi *et al.* 2004), at
121 least 200 spermatozooids were registered per sample with an optic microscope (1000 \times).
122 The viability was quantified by the percentage of live cells (undyed) and dead (pink color)
123 cells, and the sperm morphology was classified in nine main categories: normal,
124 acrosomal defect, head defect, intermediate piece defect, main piece defect, detached
125 head, proximal cytoplasmic drop, distal cytoplasmic drop and others (Brito *et al.* 2011).
126 The hypoosmotic swelling test (HOST) was used to evaluate the functional integrity of
127 the sperm membrane. This test was done using the technique described by Rahmatzade *et*
128 *al.* (2017). Each one of the seminal quality parameters was determined in the FS, CS, and
129 FZS stages, also, they were done by the same technician.

130 **Statistical analysis**

131 Data were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) using the General Linear
132 Model (GLM) procedure. The means obtained from the seminal parameters were
133 compared using a Student t-test. The effect of the use of different diluents, the states of
134 the cryopreservation process, and their interactions was considered. All data were
135 analyzed using the SAS statistical package (SAS Institute Inc. Cary. NC. USA, V9.1).
136 Differences with values of $P \leq 0.05$ were considered as significant.

137

138

RESULTS AND DISCUSSION

139 Results for the semen quality parameters evaluated on this study for semen diluted
140 with QEY, CEY, and OP and either fresh (FS), cooled (CS), or frozen (FZS) semen are
141 shown in table 1. The results obtained show that there were no significant differences upon
142 seminal quality when using diluents based on either quail or chicken egg yolk for any of
143 the semen states, either fresh or preserved by cooling or freezing. Our results are similar
144 to those reported by Kulaksiz *et al.* (2010), regarding the motility percentage and the
145 sperm membrane integrity, said authors did not find any significant differences for ram
146 semen post-thawing when using diluents based on Tris an 15% of eider quail or chicken
147 egg yolk. However, Singh *et al.* (2013) showed highly significant differences regarding
148 post-thaw motility for bull semen that was cryopreserved with diluents based in 20% of
149 quail egg yolk and compared to diluents with 20% of chicken egg yolk. Indeed, when
150 semen is frozen with diluents containing different types of egg yolk, there may be
151 differences in post-thaw semen quality, which may be due to the variation that exists in
152 the biochemical composition of the egg yolk, especially regarding fatty acids (FA),
153 phospholipids and cholesterol (Swelum *et al.* 2018).

154

155

156

157

158

159

160

Chicken egg yolk contains more monounsaturated fatty acids followed by quail
egg yolk (Su *et al.* 2008) which contains significantly more phosphatidylcholine, and less
phosphatidylethanolamine and a lower ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids
than chicken egg yolk (Trimeche *et al.* 1997). Also, quail egg yolk contains the least
quantity of oleic acid (Bathgate *et al.* 2006; Santiago-Moreno *et al.* 2008). Given that it
seems that oleic acid is toxic for goat spermatozoids, it could be expected that a better
conservation off spermatozoids could be achieved if quail egg yolk is used as an additive

161 of caprine spermatozoids (Santiago-Moreno *et al.* 2008). Nonetheless, despite the
162 variations that exist in the composition of the egg yolk in the different species of birds,
163 our results did not show differences ($P>0.05$) in the seminal quality parameters evaluated,
164 which suggests that the possible harmful effects of oleic acid present in higher
165 concentrations in chicken egg yolk could disappear when other fatty acids are present in
166 egg yolk, such as arachidonic and linoleic acids. In this regard, it has been observed that
167 arachidonic acid improves the quality parameters after thawing of the sperm of Nili-Ravi
168 buffalo bull (Ejaz *et al.* 2014) and that linoleic-oleic acid, in the presence of plasma
169 proteins of semen, improves the preservation of viability in ram semen (Santiago-Moreno
170 *et al.* 2008).

171 When comparing the effects of the diluents, for the FZS group the values for the
172 evaluated parameters decreased, however, no differences were found ($P>0.05$) [MM
173 (1.2 ± 0.3), SV (28.0 ± 13.3), MP (85.5 ± 6.3) and HOST (34.3 ± 12.9)]. Results found by Sing
174 *et al.* (2013), show that the diluents based on Tris-quail egg yolk had a better motility,
175 viability and membrane integrity (HOST) before freezing and thawing. Nonetheless, on
176 our results, when comparing the effects of the diluents, no significant statistical
177 differences were found in this variable before freezing and after thawing. Certainly, it is
178 well known that the protective action of the yolk is due to low-density lipoproteins (LDL),
179 and it is widely assumed that phospholipids form a protective film, preventing the
180 formation of ice crystals and protecting the integrity of the plasma membrane from cold
181 shock (Hu *et al.* 2010). In this regard, Ugur *et al.* (2019) mentioned that the magnitude of
182 the damage caused to the sperm membrane by the cold shock not only is due to the
183 composition of the diluents used, but it also varies according to the species. For these, it
184 can be considered that the sperm membrane of male goats is less susceptible to being
185 damaged during the cryopreservation process independently of the kind of egg yolk used
186 in this study.

187 The diluents used on our study, based on citrate- quail or chicken egg yolk,
188 contained 15% of egg yolk, and the commercial diluent had 20%. However, despite these
189 differences in our study, the semen quality parameters were similar in the three evaluation
190 stages. In contrast, results reported by Fourouzanfar *et al.* (2010), show that the post-thaw

191 sperm motility and viability are higher when a concentration of 20% of egg yolk is used,
192 compared to a 15% of egg yolk in the diluent.

193

194

CONCLUSION

195 Results of this study show that the inclusion of 15% of quail or chicken egg yolk
196 had no effect upon the quality parameters of French alpine male goats semen post-thawing
197 when compared to a commercial diluent based on Tris and 20% of chicken egg yolk.

198

199

REFERENCES

200 Akçay, E., Kulaksız, R., Daşkin, A., Çebi, Ç. and Tekin, K. (2012). The effect of different
201 dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free
202 extenders. *Survival*, **9**(10): 11.

203 Bathgate, R., Maxwell, W. M. C. and Evans, G. (2006). Studies on the effect of
204 supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types
205 on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**(1): 68-73.

206 Brito, L. F. C., Greene, L. M., Kelleman, A., Knobbe, M. and Turner, R. (2011). Effect of
207 method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, **76**(4):
208 745-750.

209 Ejaz, R., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Husna, A. U., Iqbal, R. and Akhter, S.
210 (2014). Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved
211 Nili-Ravi buffalo bull semen. *Reproduction in domestic animals*, **49**(1): 122-125.

212 Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L.,
213 Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R. and Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro
214 comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for
215 cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **73**(4): 480-487.

216 Hu, J. H., Zan, L. S., Zhao, X. L., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, Y. K. and Li, X. (2010).
217 Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in
218 frozen-thawed bovine semen. *Journal of animal science*, **88**(5): 1657-1662.

219 Jerez, R., González, N., Olaciregui, M., Luño, V., de Blas, I. and Gil, L. (2016). Use of
220 soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen
221 cryopreservation. *Small Ruminant Research*, **134**:34-38.

- 222 Kafi, M., Safdarian, M. and Hashemi, M. (2004). Seasonal variation in semen
223 characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small*
224 *ruminant research*, **53**(1-2): 133-139.
- 225 Kulaksız, R. C., Çebi, Ç., Akçay, E. and Daskın, A. (2010). The protective effect of egg
226 yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen.
227 *Small Ruminant Research*, **88**: 12-15.
- 228 Lima-Verde, I. B., Johannisson, A., Ntallaris, T., Al-Essawe, E., Al-Kass, Z., Nongbua,
229 T., Dórea F, Lundeheim N, Kupisiewicz K, Edman A, and Morrell, J. M. (2018). Effect
230 of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm
231 quality. *Reproduction in Domestic Animals*, **53**(1): 127-136.
- 232 Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D. and Anton, M. (2002). Low density
233 lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on
234 frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, **57**(6): 1695-1706.
- 235 Rahmatzadeh, M., Kohram, H., Zare Shahneh, A., Seifi-Jamadi, A. and Ahmad, E. (2017).
236 Antioxidative effect of BHA in soya bean lecithin-based extender containing Glycerol
237 or DMSO on freezing capacity of goat semen. *Reproduction in domestic animals*,
238 **52**(6): 985-991.
- 239 Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction*
240 *Science*, **62**:77-111.
- 241 Santiago-Moreno, J., Coloma, M. A., Toledano-Díaz, A., Gómez-Brunet, A., Pulido-
242 Pastor, A., Zamora-Soria, A., Carrizosa, J. A., Urrutia, B. and López-Sebastián, A.
243 (2008). A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the
244 cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, **57**(1): 25-29.
- 245 Sieme, H., Oldenhof, H. and Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants
246 for sperm preservation. *Animal reproduction science*, **169**: 2-5.
- 247 Singh, M. A., Ramteke, S. S., Ghosh, S. K., Prasad, J. K. and Rajoriya, J. S. (2013).
248 Efficacy of egg yolk from three avian species on semen freezability of Tharparkar
249 bull. *Indian Journal of Animal Reproduction*, **34**(2): 25-28.

- 250 Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X. and Tang, X. (2008). A comparison of the
 251 protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of
 252 bull sperm. *Animal reproduction science*, **104**(2-4): 212-219.
- 253 Swelum, A. A-Aziz., Saadeldin, I. M., Alanazi, M. B., Ba-Awadh, H., Afifi, M. and
 254 Alowaimer, A. N. (2018). Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris
 255 glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen, *Animal Reproduction
 256 Science*, **195**: 345-354.
- 257 Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. and Tainturier, D. (1997). Quail egg
 258 yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass
 259 sperm. *Cryobiology*, **34**(4): 385-393.
- 260 Ugur, M. R., Saber-Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini,
 261 R. I., Purwantara, B., Kaya, A. and Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation
 262 of Bull Sperm. *Frontiers in veterinary science*, **6**: 268.
- 263

264 Table 1. Mean values (\pm SEM) of mass motility (MM), sperm viability (SV), morphology
 265 (MP), and the membrane integrity test (HOST) from male goat semen diluted either with
 266 quail (QEY) or chicken (CEY) egg yolk or a commercial diluent (OP).
 267

Parameters	MM (1-5, scale)	SV (%)	MP (%)	HOST (%)
Fresh semen				
QEY	4.5 \pm 0.6 ^{ab}	85.0 \pm 4.1 ^a	87.5 \pm 5.0 ^a	91.2 \pm 2.1 ^a
CEY	4.5 \pm 0.6 ^{ab}	88.0 \pm 4.0 ^a	88.3 \pm 4.9 ^a	91.0 \pm 1.8 ^a
OP	5.0 \pm 0.0 ^a	87.5 \pm 5.0 ^a	88.0 \pm 5.4 ^a	91.3 \pm 2.2 ^a
Cooled semen				
QEY	3.7 \pm 0.5 ^{bc}	81.8 \pm 4.7 ^a	88.2 \pm 5.5 ^a	67.6 \pm 9.4 ^b
CEY	3.2 \pm 0.5 ^c	77.0 \pm 3.4 ^a	89.8 \pm 5.6 ^a	71.4 \pm 3.6 ^b
OP	3.5 \pm 0.6 ^{bc}	78.6 \pm 7.3 ^a	88.4 \pm 5.3 ^a	71.5 \pm 4.6 ^b
Frozen semen				

QEY	1.2±0.5 ^d	28.7±13.0 ^b	86.3±5.3 ^a	33.7±9.8 ^b
CEY	1.0±0.0 ^d	22.8±9.0 ^b	85.3±6.6 ^a	36.5±13.5 ^b
OP	1.5±0.6 ^d	32.3±18.1 ^b	85.0±7.1 ^a	32.7±15.5 ^b

268

269 a,b,c= Values with different literals differ between rows (P<0.05)

VI. CONCLUSIÓN GENERAL

El uso del diluyente Tris- con 20% de YH de gallina mejoro los parámetros de calidad seminal post-descongelación en comparación con el diluyente a base de lecitina de soya. La inclusión del 15% de YH de codorniz o gallina no tuvo ningún efecto sobre los parámetros de calidad del semen de los machos cabríos durante el proceso de crioconservación del espermatozoide.

