

## Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino

### Evaluation of three concentration of centrifuged egg yolk in the cryopreservation of bovine semen

Juan David Montoya-Páez<sup>1,2</sup>, Mariana Giraldo-León<sup>1</sup>, Juan Esteban Duque-Cortes<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en un diluyente comercial para semen bovino. Se obtuvo eyaculados de cuatro toros y se realizaron las colectas de semen por electroeyaculación y vagina artificial. Los espermatozoides obtenidos fueron divididos en tres alícuotas suplementadas al 10, 20 y 30% de yema de huevo centrifugada (YHC). Se realizó la congelación del semen en pajillas de 0.5 ml. Al semen descongelado se le realizó evaluaciones de la motilidad total (MT) y progresiva (MP), vitalidad (VE), morfología anormal (MA) e integridad de la membrana plasmática (IM). El análisis estadístico se realizó mediante el ajuste de modelos lineales generalizados (GLM) y la comparación de medias por la prueba de Tukey. No se encontraron diferencias significativas para la MT, VE, MA e IM entre tratamientos, pero hubo diferencias significativas para el tratamiento con la suplementación al 10% de YHC para las velocidades lineal (VSL), curvilínea (VCL) y media (VAP) con respecto al 20 y 30% de YHC ( $p < 0.05$ ). Se concluye que utilizar 10% de YHC para la criopreservación de semen bovino mejora la velocidad de los espermatozoides y favorece la preparación del diluyente para la criopreservación de las células.

**Palabras clave:** calidad seminal, congelación, espermatozoide, centrifugación

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate three concentrations of centrifuged egg yolk in a commercial diluent for bovine semen. Ejaculates from four bulls were obtained and semen collections were made by electroejaculation and artificial vagina. The sperm obtained were divided into three aliquots supplemented with 10, 20 and 30% centrifuged egg yolk

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> E-mail: [jdmontoya@elpoli.edu.co](mailto:jdmontoya@elpoli.edu.co).

Recibido: 6 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 12 de febrero de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

(YHC). Semen freezing was done in 0.5 ml straws. Thawed semen was evaluated for total (MT) and progressive motility (MP), vitality (VE), abnormal morphology (MA) and plasma membrane integrity (MI). Statistical analysis was performed by adjusting generalized linear models (GLM) and comparing means by the Tukey test. No significant differences were found for MT, VE, MA and IM between treatments, but there were significant differences for treatment with 10% YHC supplementation for linear (VSL), curvilinear (VCL) and mean (VAP) speeds with respect to 20 and 30% of YHC ( $p < 0.05$ ). It is concluded that using 10% YHC for cryopreservation of bovine semen improves the velocity of the spermatozoa and favours the preparation of the extender for cryopreservation of cells.

**Key words:** seminal quality, freeze, spermatozoa, centrifugation

## INTRODUCCIÓN

Por medio de la crioconservación se busca la estabilización de las células a temperaturas criogénicas (-196 °C), donde se detiene la actividad metabólica, permitiendo su preservación por periodos de tiempo indefinidos (Cruz *et al.*, 2006).

A pesar de que el semen bovino se ha descrito como uno de los más criotolerantes dentro de las especies domésticas, se observa una disminución considerable en su capacidad fecundante posterior al proceso de congelación (Amirat *et al.*, 2005). A pesar de sus utilidades prácticas en el campo de la reproducción, la criopreservación produce cambios adversos en la composición lipídica de la membrana, el estado del acrosoma, la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides, debido a un daño irreversible a nivel estructural y funcional de los compartimentos de las células espermáticas (Gangwar *et al.*, 2018). Por esto, se han creado diversas estrategias como la utilización de diluyentes y la suplementación del semen con sustancias crioprotectoras, estabilizantes y antioxidantes.

En la especie bovina, la yema de huevo ha sido ampliamente utilizada por presentar un efecto crioprotector (no permeable), al generar una mayor resistencia al choque térmico (Murphy *et al.*, 2018). La yema de hue-

vo se considera como uno de los componentes esenciales en los diluyentes (Crespilho *et al.*, 2012), Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son el principal componente en los diluyentes con yema de huevo, pues evitan la pérdida de fosfolípidos de la membrana, aumentan la tolerancia al frío y reducen las lesiones durante la criopreservación (Medeiros *et al.*, 2002; Muiño *et al.*, 2007).

Diversos investigadores han sugerido la sustitución de los diluyentes que contienen productos de origen animal como la yema, por posibles riesgos de contaminación por bacterias, hormonas, drogas u otros microorganismos, siendo una posible fuente de endotoxinas capaces de afectar la capacidad de fecundación de los espermatozoides (Bousseau *et al.*, 1998; Amirat *et al.*, 2005). Esto ha conllevado al desarrollo de diluyentes alternativos libres de productos derivados de animales (Murphy *et al.*, 2018). Así mismo, los diluyentes de origen vegetal, en algunos casos son preferidos para la comercialización internacional para evitar una posible contaminación de la yema de huevo con microorganismos por lo anteriormente mencionado (Van Wagtendonk-de Leeuw *et al.*, 1999); sin embargo, el uso de estos diluyentes suplementados con yema de huevo han presentado, en algunos casos, mejores resultados de calidad del semen posdescongelación, con respecto a diluyentes alternativos como los de origen vegetal (Abdel-Aziz *et al.*, 2019).

Por esta falencia se requiere estandarizar la concentración de yema de huevo utilizando yemas centrifugadas que permitan obtener rendimientos óptimos después de la criopreservación. Resultados de investigación indican que la suplementación con lipoproteínas de baja densidad (LDL) y otras sustancias crioprotectoras como azúcares (Varela *et al.*, 2019), pueden mejorar la calidad pos-descongelación del semen bovino. El objetivo de esta investigación fue evaluar varias concentraciones de yema de huevo centrifugada en un diluyente comercial para la criopreservación de semen bovino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y Colecta de Semen

El material de investigación fue recolectado en los municipios de Marinilla, Envigado y Rionegro en el departamento de Antioquia (Colombia). Se utilizaron cuatro toros para la recolección de tres eyaculados por animal. Los animales se encontraban en condiciones óptimas de alimentación, ambiente, manejo reproductivo, con condición corporal entre 3 y 4 (escala 1-5, siendo 1 extremadamente delgado y 5 extremadamente obeso). Las colectas se realizaron con vagina artificial o con electroeyaculador, indistintamente del animal o número de colecta.

El volumen se determinó utilizando una probeta graduada, la concentración del semen mediante un fotómetro Spermacue® (Minitube, Alemania). Los 12 eyaculados tuvieron una concentración no menor de 500 millones cel/ml y una motilidad superior o igual al 60%. El semen fue diluido acorde con lo indicado para cada tratamiento y fue llevado al Laboratorio de Biotecnología Animal (Medellín, Colombia) en refrigeración utilizando un equipo especializado (Equitainer®, Minitube). Las distancias entre los municipios de Marinilla, Envigado y Rionegro

hasta el Laboratorio de Biotecnología fueron de 48.2, 23.4 y 44.9 km, respectivamente, y los tiempos de traslado oscilaron entre 50 y 70 minutos. Al arribo al laboratorio se determinó la movilidad espermática, la morfología anormal, la vitalidad espermática y la integridad de membrana (HOS) previo a la congelación.

### Preparación de la Yema de Huevo

La yema huevo fue diluida en una proporción de 3:1 con agua ultra-pura y centrifugada a 3400 x g durante 100 minutos. Se extrajo el sobrenadante y este fue empleado en la suplementación de los medios de congelación en tres concentraciones (10, 20 y 30%), según el protocolo modificado de Nouri *et al.* (2013).

### Criopreservación de Semen

El semen fue dividido en tres alícuotas para la criopreservación utilizando como medio base de congelación el diluyente comercial Trilady® (Minitub, Alemania) suplementado con la yema de huevo centrifugada en las tres concentraciones indicadas.

El semen de cada tratamiento fue diluido a una concentración de  $60 \times 10^6$  espermatozoides/ml, enfriado de 32 a 5 °C, y equilibrado en nevera a 5 °C durante 90 minutos, según el protocolo descrito por Amirat *et al.* (2004) y Jian-Hong *et al.* (2011). Posteriormente, el semen fue empacado en pajillas de 0.5 ml, mediante un equipo automático de empaque y sellado de pajillas por ultrasonido (MRS1 Dual V2, IMV Technologies, Francia) y se mantuvieron nuevamente a una temperatura de 5 °C durante 30 minutos. Luego fueron llevadas a vapores de nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -120 °C durante 15 minutos donde finalmente fueron sumergidas en un tanque de nitrógeno líquido (IMV Technologies, Francia) para su almacenamiento.

## Evaluación Seminal Post-descongelación

La motilidad y la cinética espermática se evaluaron mediante el sistema Sperm Class Analyzer (SCA<sup>®</sup>, Microptic, España) según lo descrito por Restrepo *et al.* (2013). Se ajustó la configuración del sistema para la especie bovina, con base al tamaño de partícula, la concentración de la muestra y el número de espermatozoides evaluados. Se utilizó un microscopio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Japón) con una cámara digital (Scout SCA780, Basler, USA). Se evaluó la movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), y la velocidad lineal (VSL), curvilínea (VCL) y media (VAP).

La morfología anormal (MA) fue evaluada por la técnica de eosina-nigrosina modificada por Barth y Oko (1989), donde sobre un portaobjetos se depositó una gota de muestra y una gota de eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich, USA). Ambas gotas se mezclaron y se realizó un extendido, el cual se fijó sobre una platina térmica a 37 °C. Se realizó la evaluación de la morfología de 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Japón).

Se determinó la vitalidad espermática (VE) utilizando el procedimiento descrito por Gamboa *et al.* (2010), con el kit Live/Dead (Molecular Probes, USA). Se suspendieron 200  $\mu$ l de semen, en solución Hanks Heppes (HH) con 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich, USA), para una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml. La mezcla se incubó a 37 °C durante 8 minutos, con 6 mM de SYBR-14. Seguidamente se incubó de la misma manera, con 0.48 mM de yoduro de propidio (IP). Luego, a partir de una muestra de 5  $\mu$ l, se evaluaron 200 espermatozoides mediante un filtro UV-2A de un microscopio E200 con fluorescencia HBO (Nikon, Japón).

Se avaluó la integridad funcional de la membrana plasmática (HOS) mediante la-

prueba hipoosmótica descrita por Neild *et al.* (1999). Se tomaron 100  $\mu$ l de semen y se adicionaron a un tubo con 500  $\mu$ l de una solución hipoosmótica de sacarosa 5.4% (100 mOs-mol/l). La mezcla se incubó a 38.5 °C durante 30 minutos y seguidamente se evaluó la reacción de 200 espermatozoides por microscopia de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon).

## Evaluación Estadística

Se realizó un modelo completamente al azar. Para evaluar las fuentes de variación se ajustó un modelo lineal generalizado (GLM) para cada una de las variables dependientes. La evaluación de la normalidad fue realizada por la prueba de Shapiro-Wilk. Se incluyeron los efectos fijos de fecha de recolección, bovino y la concentración de yema de huevo centrifugada, y como segundo efecto las interacciones entre las variables MP, MT, VCL, VSL, VAP, VE, MA e IM. Las comparaciones de medias entre los experimentos se realizaron mediante la prueba de Tukey. Todas las evaluaciones fueron realizadas con el programa SAS 9.2 (SAS, USA).

## RESULTADOS

Se realizó la crioconservación y evaluación de 144 pajillas de semen (4 pajillas por cada eyaculado [12] y por cada tratamiento [3]). Los modelos estadísticos explicaron en una alta proporción ( $R^2 > 0.72-0.50$ ) las variables dependientes MT, MP y VE, mientras que los parámetros cinéticos (VCL, VSL y VAP) fueron explicados en menor medida por los efectos incluidos ( $R^2 = 0.50-0.40$ ). En los modelos estadísticos para la MT y la VE fue significativo el eyaculado del toro ( $p < 0.05$ ), para la MP, VCL y VSL fueron significativos el eyaculado del toro y el tratamiento ( $p < 0.05$ ), y para la VAP fue significativo el tratamiento ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 1. Evaluación de semen bovino fresco, diluido y suplementado con tres concentraciones de yema de huevo centrifugada (10, 20 y 30%)

Variable	Tratamiento (yema de huevo centrifugada)		
	10%	20%	30%
MT (%)	92.35 ± 6.95	88.73 ± 9.18	94.09 ± 5.03
MP (%)	79.01 ± 8.09	64.17 ± 32.17	78.27 ± 10.89
VCL (µm/s)	100.3 ± 5.74	86.28 ± 20.93	95.03 ± 12.57
VSL (µm/s)	45.47 ± 9.46	37.28 ± 12.94	43.15 ± 12.40
VAP (µm/s)	68.77 ± 7.33	55.10 ± 15.52	64.78 ± 13.47
VE (%)	83.00 ± 15.55	81.50 ± 15.15	86.0 ± 9.02
MA (%)	18.40 ± 4.33	18.60 ± 3.71	21.33 ± 5.0
IM (%)	54.0 ± 11.78	53.40 ± 8.61	55.16 ± 12.28

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar

MT: Movilidad total, MP: Movilidad progresiva, VCL: Velocidad curvilínea, VSL: Velocidad lineal, VAP: Velocidad media, VE: Vitalidad espermática, MA: Morfología anormal, IM: Integridad de membranas

Cuadro 2. Evaluación pos-descongelación de semen bovino diluido y suplementado con tres concentraciones de yema de huevo centrifugada (10, 20 y 30%)

Variable	Tratamiento (yema de huevo centrifugada)		
	YHC10%	YHC20%	YHC30%
MT (%)	58.40 ± 24.84 <sup>a</sup>	58.14 ± 22.56 <sup>a</sup>	53.19 ± 23.79 <sup>a</sup>
MP (%)	40.09 ± 21.0 <sup>a</sup>	35.66 ± 16.79 <sup>ab</sup>	30.87 ± 17.21 <sup>b</sup>
VCL (µm/s)	70.93 ± 12.38 <sup>a</sup>	60.15 ± 10.58 <sup>b</sup>	54.26 ± 7.79 <sup>b</sup>
VSL (µm/s)	31.56 ± 7.82 <sup>a</sup>	27.54 ± 7.57 <sup>b</sup>	26.26 ± 4.74 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	47.81 ± 11.3 <sup>a</sup>	39.28 ± 8.84 <sup>b</sup>	36.77 ± 5.28 <sup>b</sup>
VE (%)	65.03 ± 6.47 <sup>a</sup>	67.60 ± 7.86 <sup>a</sup>	65.97 ± 5.13 <sup>a</sup>
MA (%)	23.70 ± 6.58 <sup>a</sup>	23.25 ± 6.86 <sup>a</sup>	23.79 ± 7.46 <sup>a</sup>
IM (%)	32.63 ± 7.05 <sup>a</sup>	35.28 ± 9.77 <sup>a</sup>	31.29 ± 10.64 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar

MT: Movilidad total, MP: Movilidad progresiva, VCL: Velocidad curvilínea, VSL: Velocidad lineal, VAP: Velocidad media, VE: Vitalidad espermática, MA: Morfología anormal, IM: Integridad de membranas

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de filas denotan diferencia estadística significativa (p<0.05)

YHC10, YHC20, YHC30: Yema de huevo centrifugada 10, 20 y 30%, respectivamente.

Los coeficientes de variación (CV) para MT y MP fueron de 40.8 y 56.2%, respectivamente. Para los demás parámetros se hallaron CV menores al 30%. El Cuadro 1 presenta los resultados para los parámetros de calidad seminal previos a la congelación del semen bovino suplementado con tres concentraciones de yema de huevo.

No se encontraron diferencias significativas por efecto de la concentración de la yema de huevo centrifugada en la MT, VE, MA e IM. Sin embargo, hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al emplear un 10% de yema huevo centrifugada en la suplementación de los diluyentes con respecto a VCL, VSL y VAP. El Cuadro 2 presenta los resultados de la evaluación espermática post-descongelación del semen criopreservado en presencia de tres concentraciones diferentes de yema de huevo en el diluyente

## DISCUSIÓN

El uso de yema de huevo en los diluyentes de congelación se debe principalmente al aporte en LDL compuestos por triglicéridos y colesterol (Moussa *et al.*, 2002), permitiendo la prevención en la formación de cristales de hielo y, de esa forma, protegiendo la membrana plasmática durante la congelación y la descongelación (Morillo-Rodríguez, 2013). Además, la criopreservación puede afectar la organización de los lípidos y la composición química de la membrana plasmática de los espermatozoides (Jiang-Hong *et al.*, 2011). Por esto, un diluyente que contiene LDL es menos complejo en la composición química que el diluyente estándar de yema de huevo (Jiang-Hong *et al.*, 2011).

Se sabe que la capacidad del esperma para soportar los protocolos de congelación y descongelación se basa en algunos parámetros como la movilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides (Contri *et al.*, 2012; Yeste *et al.*, 2015). En el

presente estudio se encontraron valores similares en las medias para los tratamientos pre-congelación al 10, 20 y 30% de yema de huevo centrifugada (YHC) en MT, MP, VE, MA e IM (Cuadro 1); sin embargo, Gangwar *et al.* (2018) encontraron valores de  $68 \pm 1.11\%$ ,  $81.50 \pm 0.73\%$  y  $71.40 \pm 0.69$  para MT, VE e IM, respectivamente, antes de la congelación con YHC al 20%, donde los valores en la MT fueron superiores en la presente investigación y equiparables para los otros parámetros.

Tarig *et al.* (2017) utilizando yema de huevo en concentraciones del 12 y 20% reportan valores relativamente similares para motilidad total, vitalidad espermática e integridad de la membrana que en el presente estudio, pero con resultados significativamente mejores con la suplementación de 20% de yema de huevo, a diferencia del presente estudio donde no hubo diferencias significativas en la suplementación con YHC al 10 y al 20% para la MT, MP, VE, MA e IM (Cuadro 2).

Iaffaldano *et al.* (2014) encontraron como mejor alternativa para la congelación de semen de conejos la utilización de LDL extraídas de yema de huevo por centrifugación en una concentración del 10% para la motilidad total y la movilidad progresiva, a diferencia del presente estudio donde no hubo efecto del nivel de yema de huevo para estos parámetros. Sin embargo, se coincide con dicho estudio donde la concentración del 10% aporta mejores valores en los parámetros de VCL, VSL y VAP. Esto puede ser debido a que una mayor concentración en yema de huevo genera una mayor viscosidad del medio (Sariozkan *et al.*, 2010; Nouri *et al.*, 2013), pudiendo influir sobre las velocidades analizadas cuando se incrementaron las concentraciones de la yema de huevo.

Son pocos los estudios que evalúan específicamente los parámetros de cinética para VCL, VSL y VAP; sin embargo, Rastergania *et al.* (2013) en semen de búfalos utilizando diluyentes de congelación libres

de yema de huevo reportaron valores de  $40.1 \pm 5.25 \mu\text{m/s}$ ,  $15.9 \pm 6.28 \mu\text{m/s}$  y  $21.6 \pm 7.06 \mu\text{m/s}$  para VCL, VSL y VAP, respectivamente, siendo estos valores inferiores a los encontrados en la presente investigación. Esto puede ser un indicativo que la suplementación en la congelación de semen en bovinos con LDL provenientes de la yema de huevo se convierten en una alternativa viable para la criopreservación de las células espermáticas.

El tratamiento del 10%, presenta mejores resultados en cuanto a las velocidades espermáticas (VCL, VSL y VAP). Además, puede considerarse que concentraciones altas de yema de huevo en los diluyentes de congelación podrían desencadenar procesos de peroxidación lipídica en el medio y, por consiguiente, el efecto deletéreo sobre las membranas plasmáticas de los espermatozoides (Montoya *et al.*, 2017).

## CONCLUSIÓN

La yema de huevo centrifugada en concentraciones de 10% provee mejores resultados para los parámetros de velocidad lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y velocidad media (VAP).

## LITERATURA CITADA

1. **Abdel -Aziz A, Saadeldin IM, Ba-Awadh H, Al-Mutary MG, Moumen AF, Alowainier AN, Abdalla H. 2019.** Efficiency of commercial egg yolk-free and egg yolk-supplemented tris-based extenders for dromedary camel semen cryopreservation. *Animals* 9: 1-15. doi: 10.3390/ani9110999
2. **Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. 2005.** Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 129: 535-543. doi: 10.1530/rep.1.00011
3. **Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorina C, Gérard O, Courtens J, 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: 895-907. doi: 10.1016/s0093-691x(03)00259-0
4. **Barth A, Oko R. 1989.** Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa, USA: Iowa State University Press. 285 p.
5. **Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. 1998.** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00175-7
6. **Contri A, Alessia G, Domenico R, Michele P, Sfirro M, Carluccio A. 2012.** Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Anim Reprod Sci* 136: 74-80. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.022
7. **Crespilho A, Sá Filho M, Dell'Aqua J, Nichi M, Monteiro G, Avanzi B, Martins A, et al. 2012.** Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin-based extenders. *Livest Sci* 149: 1-6. doi: 10.1016/j.livsci.2012.05.011
8. **Cruz P, Medina V, Velasco Y. 2006.** Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Colomb Cienc Pec* 19: 153-159.
9. **Gamboa S, Rodrigues A, Henriques L, Batista C, Ramalho-Santos J. 2010.** Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 73: 950-958. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.023
10. **Gangwar C, Saxena A, Patel A, Singh SP, Yadav S, Kumar R, Singh V. 2018.** Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen.

- Anim Reprod Sci 192: 171-178 doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.005
11. **Iaffaldano N, Di Iorio M, Rosato MP, Manchisi A. 2014.** Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. Anim Reprod Sci 151: 220-228. doi: 10.1016/j.anire-prosci.-2014.10.020
  12. **Jian-Hong H, Zhong-Liang J, Rui-Kai L, Qing-Wang L, Shu-Shan Z, Lin-Sen Z, Yao-Kun L, Xin L. 2011.** The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. Cryobiology 62: 83-87. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.12.007
  13. **Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 57: 327-344. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00674-4
  14. **Montoya JD, Rojano B, Restrepo G. 2017.** Efecto de la suplementación del diluyente sobre la calidad del semen de asno a la descongelación. Arch Zootec 66: 333-340. doi: 10.21071/az.v66i255.-2508
  15. **Morillo-Rodríguez A. 2013.** Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. Tesis Doctoral. España: Univ. de Extremadura. 168 p.
  16. **Moussa M, Marinnet 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: 1695-1706. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00682-9
  17. **Muiño R, Fernandez M, Peña A. 2007.** Post thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk based or two egg yolk free extenders after an equilibration period of 18 h. Reprod Domest Anim 42: 305-311. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00784.x
  18. **Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. 2018.** Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on *in vitro* sperm kinematics and *in vivo* fertility of frozen-thawed bull semen. Anim Reprod Sci 191: 70-75. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.02.010
  19. **Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agiiero A. 1999.** Hypoosmotic test in equine spermatozoa. Theriogenology 51: 721-727. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00021-7
  20. **Nouri H, Towwhidi A, Zhandi M, Sadeghi R. 2013.** The effects of centrifuged egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze Caspian horse semen. J Equine Vet Sci 33: 1050-1053. doi: 10.1016/j.jevs.2013.03.184
  21. **Rastergania A, Ahahverdi A, Topragleh TH, Ebrahimi B, Shapiour V. 2013.** Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. Cell J 14: 306-313.
  22. **Restrepo G, Ocampo D, Velásquez A. 2013.** Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase. Rev UDCA Act Div Cient 16: 445-450.
  23. **Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Buyukleblebici S, Kinet H, Bilgen A. 2010.** The effects of different egg yolk concentrations used with soybean lecithin-based extender on semen quality to freeze bull semen. Eurasian J Vet Sci 26: 45-49
  24. **Tarig AA, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Goh YM, Baiee FH, Khumran AM, et al. 2017.** Effect of different concentration of yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. Anim Reprod Sci 182: 21-27. doi: org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.024

25. **Van Wagtendonk-de Leeuw AM, Haring AM, Kaal-Lansbergen LM, den Daas JH. 1999.** Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology* 54: 57-67. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00324-1
26. **Varela E, Rojano BA, Restrepo G. 2019.** Efecto de las lipoproteínas de baja densidad y la trehalosa sobre la actividad enzimática antioxidante del semen bovino criopreservado. *Rev Inv Vet Perú* 30: 256-264. doi: 10.15381/rivep.v30i1.-15680
27. **Yeste M, Estrada E, Rocha L, Marín H, Rodríguez-Gil J, Miró J. 2015.** Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology* 3: 395-407. doi: 10.1111/andr.291