

## Artículo

# Influencia del tiempo de descongelación en la motilidad, viabilidad y estructura del acrosoma en espermatozoides de toros *Bos indicus*

## *The influence of thawing time on the motility, viability and acrosome structure of Bos indicus bull spermatozoa*

Jessica Aracely Intriago Mariño<sup>1</sup>, Diego Javier Conrado Palma<sup>2</sup>, Javier Enrique Camacho Castillo<sup>3</sup>, Ricardo Lenin Bastidas Espinoza<sup>4,\*</sup>, Gerald Amador Saldarreaga Chichande<sup>5</sup> y Odalis Celine Vilela Sabando<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de ciencias pecuarias y biológicas Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0005-6555-6573>; [jintriagom@uteq.edu.ec](mailto:jintriagom@uteq.edu.ec)

<sup>2</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de ciencias pecuarias y biológicas Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0000-0002-1917-0814>; [dconradop@uteq.edu.ec](mailto:dconradop@uteq.edu.ec)

<sup>3</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de ciencias pecuarias y biológicas Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0008-3981-2694>; [jcamachoc3@uteq.edu.ec](mailto:jcamachoc3@uteq.edu.ec)

<sup>4</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de ciencias pecuarias y biológicas, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0001-4331-7492>

<sup>5</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de ciencias pecuarias y biológicas, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0004-0029-9185>; [gsaldarreagac@uteq.edu.ec](mailto:gsaldarreagac@uteq.edu.ec)

<sup>6</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de ciencias pecuarias y biológicas, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0004-0949-3646>; [ovilelas@uteq.edu.ec](mailto:ovilelas@uteq.edu.ec)

**Cita:** Intriago Mariño, J. A., Conrado Palma, D. J., Camacho Castillo, J. E., Bastidas Espinoza, R. L., Saldarreaga Chichande, G. A., & Vilela Sabando, O. C. (2026). Influencia del tiempo de descongelación en la motilidad, viabilidad y estructura del acrosoma en espermatozoides de toros *Bos indicus*. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 4(1), 74-87. <https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n1/111>

Correspondencia: [rbastidase@uteq.edu.ec](mailto:rbastidase@uteq.edu.ec)

 <https://doi.org/10.70881/mcj/v4/n1/111>

**Recibido:** 02/12/2025  
**Revisado:** 14/01/2026  
**Aceptado:** 16/01/2026  
**Publicado:** 19/01/2026



**Copyright:** © 2026 por los autores. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la **Licencia Creative Commons, Atribución-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)**.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Resumen:** La criopreservación de semen bovino es una herramienta estratégica para la inseminación artificial, pero su eficacia depende en gran medida del protocolo de descongelación, ya que la exposición térmica puede intensificar el daño criogénico sobre membranas y el acrosoma. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tres tiempos de descongelación en baño María a 37 °C T1 (35 s), T2 (50 s) y T3 (65 s) sobre la calidad funcional y estructural de semen preservado de toros *Bos indicus*, mediante parámetros de motilidad, cinemática espermática e integridad celular. Se aplicó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento; la motilidad y variables cinemáticas se midieron con un sistema de análisis computarizado (CASA) y la integridad se determinó por Eosina–Nigrosina (viabilidad y membrana plasmática) y Giemsa (estado acrosomal). La motilidad total fue mayor en T1 (45,03%) en comparación con T2 (40,84%) y T3 (43,14%), mientras que la motilidad progresiva se mantuvo similar entre tratamientos; en contraste, la linealidad aumentó de 0,41 a 0,52 y la rectitud de 0,77 a 0,86 al incrementar el tiempo de exposición. Sin embargo, la

viabilidad disminuyó marcadamente de 44,56% (T1) a 16,49% (T2) y 8,59% (65 s), con mortalidad de 91,41% en T3, y el acrosoma intacto se redujo de 53,66% (T1) a 16,33% (T3). Se concluye que, aunque tiempos prolongados favorecen trayectorias más rectas, comprometen severamente la integridad espermática, por lo que 35 s a 37 °C representa el mejor balance operativo para preservar el potencial fecundante dentro del rango evaluado.

**Palabras clave:** Semen, CASA, Crio preservación, Acrosoma, viabilidad y motilidad

**Abstract:** Bovine semen cryopreservation is a strategic tool for artificial insemination; however, its effectiveness depends largely on the thawing protocol, since thermal exposure can intensify cryogenic damage to sperm membranes and the acrosome. The objective of this study was to evaluate the effect of three thawing times in a 37 °C water bath T1 (35 s), T2 (50 s), and T3 (65 s) on the functional and structural quality of preserved semen from *Bos indicus* bulls, using motility, sperm kinematics, and cell integrity as response parameters. A completely randomized design with three replicates per treatment was applied; motility and kinematic variables were measured using a computer-assisted sperm analysis system (CASA), and integrity was assessed by Eosin–Nigrosin staining (viability and plasma membrane integrity) and Giemsa staining (acrosomal status). Total motility was higher in T1 (45.03%) compared with T2 (40.84%) and T3 (43.14%), while progressive motility remained similar among treatments; in contrast, linearity increased from 0.41 to 0.52 and straightness from 0.77 to 0.86 as exposure time increased. However, viability decreased markedly from 44.56% (T1) to 16.49% (T2) and 8.59% (T3), with mortality reaching 91.41% in T3, and the proportion of sperm with intact acrosomes declined from 53.66% (T1) to 16.33% (T3). It is concluded that, although longer thawing times promote straighter trajectories, they severely compromise sperm integrity; therefore, 35 s at 37 °C provides the best operational balance to preserve fertilizing potential within the evaluated range.

**Keywords:** Semen, CASA, cryopreservation, acrosome, viability and motility

## 1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen bovino es un pilar de la biotecnología reproductiva, ya que permite la conservación a largo plazo del germoplasma y, combinada con la inseminación artificial, favorece la rápida diseminación de genética de alta calidad a nivel de hato (Engdawork et al., 2024). En los sistemas de producción, el uso de semen conservado también representa una ventaja económica, porque reduce la necesidad de mantener y transportar machos reproductores y disminuye los riesgos sanitarios asociados a la transmisión de enfermedades venéreas (Sharafi et al., 2022). Dado que las tecnologías de reproducción asistida dependen de la competencia funcional de los espermatozoides (Montero-De-La-Cueva, 2023).

Dentro de los protocolos de inseminación artificial, la descongelación es una etapa crítica: condiciones subóptimas pueden comprometer la funcionalidad espermática y, en consecuencia, reducir la fertilidad (Koch et al., 2022). El resultado de la descongelación depende de múltiples factores, entre ellos la composición del diluyente, la temperatura de descongelación y el tiempo durante el cual la pajueta permanece a la temperatura seleccionada (Wang et al., 2023). Por lo tanto, definir un tiempo de descongelación sustentado en evidencia es necesario para preservar atributos espermáticos clave que determinan la capacidad fecundante (Neubert et al., 2025).

A pesar de la información disponible para *Bos taurus*, el tiempo óptimo de

descongelación para semen de *Bos indicus* cuenta con un respaldo menos consistente en estudios específicos, lo que genera incertidumbre en las unidades productivas que dependen cada vez más del semen congelado para inseminación artificial, transferencia de embriones y producción de embriones *in vitro* (Leite et al., 2022). Investigaciones desarrolladas en centros de reproducción animal de Brasil y España han confirmado que el tiempo de descongelación influye directamente en la integridad de la membrana plasmática, la funcionalidad acrosomal y los parámetros cinéticos evaluados mediante sistemas CASA (WiJaya et al., 2023).

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia del tiempo de descongelación sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal en semen de *Bos indicus*, utilizando un sistema de Análisis Computarizado de Semen y técnicas de tinción complementarias. en la zona ganadera de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, con ensayos realizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Área de estudio

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Campus Santo Domingo, ubicado en la Av. Zoila Luz, Vía Santo Domingo–Quevedo Km 24, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador, donde se realizó el calentamiento de las pajuelas y la evaluación de la calidad espermática mediante CASA y técnicas de tinción.

### 2.2. Diseño experimental

Se implementó un diseño completamente al azar (DCA) orientado a cuantificar el efecto del tiempo de descongelación sobre la funcionalidad espermática de semen criopreservado de toros *Bos indicus*. Se definieron tres tratamientos correspondientes a tiempos de exposición en baño María a temperatura controlada y tres repeticiones por tratamiento, conformando 9 unidades experimentales. La unidad experimental se estableció como 0,50 mL de semen procesado de forma independiente.

**Tabla 1.**

Tratamientos del estudio

Tratamiento	Condición experimental (37 °C)
T1	35 s
T2	50 s
T3	65 s

### 2.3. Condiciones de descongelación y preparación preanalítica

Se acondicionó un baño María con 6 L de agua destilada y se estabilizó a 37 °C, verificando la temperatura antes de iniciar cada corrida. En paralelo, el sistema CASA se encendió con antelación y se ajustó la platina del microscopio a 37 °C, manteniéndola en estabilización térmica durante 15 min, con el fin de minimizar variaciones por choque

térmico en la lectura (García-Molina et al., 2023).

Cada pajuela se retiró del nitrógeno líquido con pinza, se introdujo de inmediato en el baño María (37 °C) y se mantuvo según el tratamiento asignado (35, 50 o 65 s). Finalizado el tiempo, la pajuela se secó con papel absorbente para evitar arrastre de agua, se cortó uno de sus extremos y el semen se transfirió a un tubo estéril rotulado. Las evaluaciones se realizaron de forma consecutiva para reducir el tiempo entre descongelación y medición, debido a que la calidad espermática puede modificarse rápidamente después del descongelamiento (Mofadel et al., 2024).

#### **2.4. Evaluación de motilidad mediante sistema CASA**

La motilidad se determinó mediante un sistema de Análisis Computarizado de Semen (CASA). Para cada unidad experimental se tomaron 10 µL de semen descongelado y se cargaron en una cámara Leja, evitando burbujas y garantizando una distribución homogénea de la muestra (Del Prete et al., 2022). La lectura se efectuó en el microscopio del equipo con objetivo de contraste de fase 40×, evaluando seis campos por muestra para obtener una estimación representativa y disminuir la variabilidad de la muestra. Los parámetros se registraron directamente en el software del sistema para su posterior procesamiento estadístico (Poclin-Rojas et al., 2025).

#### **2.5. Viabilidad espermática**

La viabilidad se estimó mediante tinción Eosina–Nigrosina, basada en la integridad de la membrana plasmática. Los espermatozoides con membrana alterada incorporan eosina y se observan rosados (no viables), mientras que los espermatozoides con membrana íntegra permanecen sin tinción evidente o con aspecto claro (viables). La evaluación se realizó bajo microscopía óptica, clasificando las células en viables y no viables para calcular el porcentaje correspondiente por tratamiento (Gupta et al., 2025).

#### **2.6. Integridad acrosomal**

La integridad del acrosoma se determinó con tinción Giemsa, método ampliamente utilizado para evidenciar la conservación de la membrana acrosomal. En esta tinción, el acrosoma se observa azul claro y el núcleo azul intenso (Ruthrakumar et al., 2024). Los espermatozoides se clasificaron como acrosoma intacto cuando la estructura acrosomal se mantuvo definida y continua, y como no intacto cuando se evidenciaron pérdidas, discontinuidades o alteraciones compatibles con daño acrosomal. Este indicador es relevante debido a su relación directa con la capacidad de reacción acrosomal y, por ende, con el potencial fecundante (Serafini et al., 2025).

#### **2.7. Variables de respuesta y análisis estadístico**

Se evaluaron indicadores funcionales y estructurales del espermatozoide posteriores a la descongelación. Las mediciones se realizaron de manera inmediata tras el procedimiento de descongelación, bajo condiciones térmicas estandarizadas, utilizando el sistema CASA y técnicas de tinción diferencial para cuantificar la respuesta espermática por tratamiento.

El procesamiento estadístico se realizó en Infostat, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar diferencias entre los tres tiempos de descongelación. Cuando

el efecto del tratamiento resultó significativo, las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Motilidad y funcionalidad espermática

La evaluación del tiempo de descongelamiento evidenció que la respuesta de la motilidad espermática varió de manera descriptiva entre tratamientos en semen criopreservado de *Bos indicus*. El tratamiento T1 (37 °C) registró la mayor motilidad total (45,03%) en comparación con T2 (40,84%) y T3 (43,14%).

Aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas para motilidad total ni motilidad progresiva, el patrón observado sugiere que T1 conserva de forma más estable la capacidad de movimiento inmediatamente posterior al calentamiento. Adicionalmente, la menor exposición requerida en T1, junto con su desempeño en motilidad, respalda su conveniencia operativa dentro del rango evaluado, al sostener un perfil de movimiento comparable o superior sin extender el tiempo de contacto térmico, condición que puede resultar crítica para preservar otros atributos funcionales.

**Tabla 2.**

Análisis de la motilidad total y progresiva del semen

Tratamientos	Motilidad total (%)	Motilidad progresiva (%)
T1	45,03 a	30,06 a
T2	40,84 a	30,62 a
T3	43,14 a	26,44 a
CV (%)	14,32	18,63

**Nota.** Los valores corresponden a medias aritméticas. Letras iguales en una misma columna indican ausencia de diferencias estadísticas significativas entre grupos, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

#### 3.2. Estructura poblacional

La Tabla 3 presenta la respuesta cinemática y estructural de la población espermática tras el calentamiento post-preservación a 37 °C. En términos generales, la mayoría de los descriptores cinemáticos no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos; sin embargo, el patrón descriptivo fue consistente con un mejor desempeño en T1, particularmente en variables asociadas con vigor y expresión del movimiento.

En este sentido, la velocidad curvilínea (VCL) alcanzó su mayor valor en T1 (157,56  $\mu\text{m/s}$ ), mientras que en T2 y T3 se registraron valores inferiores (135,91 y 134,22  $\mu\text{m/s}$ , respectivamente). De forma complementaria, el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batido de cola (BCF) tendieron a presentar valores relativamente más altos en T1, lo cual está asociado a mayor actividad flagelar dentro de la fracción móvil.

En los parámetros de progresividad, se evidenció un comportamiento diferenciado: la linealidad (LIN) y la rectitud (STR) aumentaron conforme se prolongó el tiempo de

calentamiento, con valores superiores en T3 frente a T1. Este resultado describe un desplazamiento más rectilíneo a mayor tiempo.

Los indicadores de integridad fueron los más sensibles al tiempo del procedimiento. El porcentaje de espermatozoides vivos fue significativamente mayor en T1 (44,56%), pero disminuyó de forma abrupta en T2 (16,49%) y T3 (8,59%). De manera concordante, la proporción de espermatozoides muertos aumentó con el tiempo, alcanzando su valor máximo en T3 (91,41%), lo que confirma que exposiciones prolongadas a 37 °C intensifican el daño de membrana plasmática posterior a la preservación.

Un comportamiento similar se observó en la integridad acrosomal, donde el porcentaje de acrosoma intacto se redujo marcadamente desde T1 (53,66%) a T2 (37,07%) y T3 (16,33%), mientras que el acrosoma no intacto se incrementó hasta T3 (83,67%). Estos valores indican que, aunque la prolongación del tiempo puede asociarse con mayores valores de LIN y STR, la pérdida simultánea de viabilidad y conservación acrosomal implica una reducción del potencial fecundante.

**Tabla 3.**

Estructura y cinemática de las poblaciones

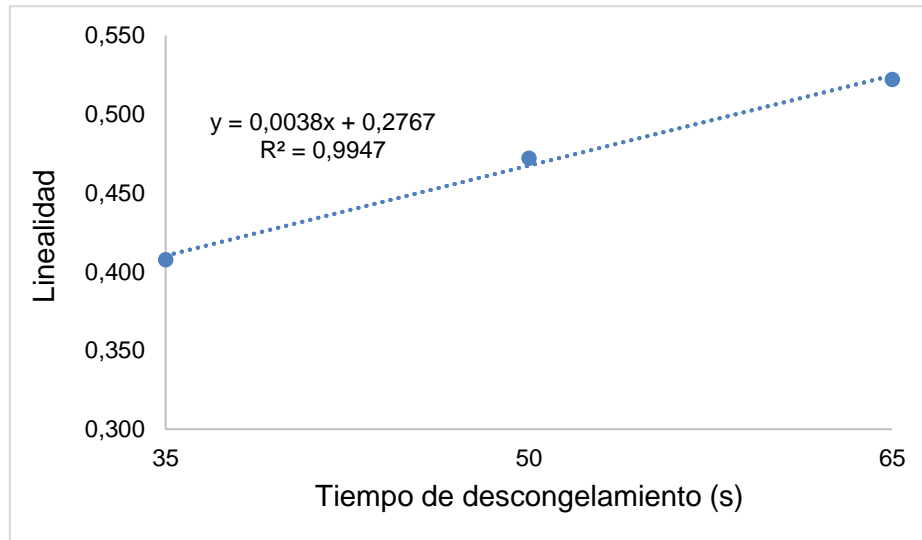
<b>Variables</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>CV (%)</b>
Movilidad lineal	14,97 a	8,00 a	17,13 a	46,11
Inmovilidad	56,08 a	59,10 a	56,86 a	10,93
Velocidad curvilínea (VCL)	157,56 a	135,91 a	134,22 a	9,67
Velocidad promedio (VAP)	80,19 a	76,78 a	81,66 a	8,18
Velocidad rectilínea (VSL)	63,60 a	63,24 a	70,93 a	9,99
Linealidad (LIN)	0,41 b	0,47 ab	0,52 a	9,56
Rectitud del movimiento (STR)	0,77 b	0,82 ab	0,86 a	3,21
Frecuencia de batido de cola (BCF)	27,73 a	25,31 a	26,87 a	4,16
Desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH)	5,41 a	5,11 a	4,57 a	6,72
Viabilidad espermática (%)	44,56 a	16,49 b	8,59 b	40,30
Mortalidad de Espermatozoides (%)	55,43 b	83,51 b	91,41 a	12,19
Acrosoma intacto (%)	53,66 a	37,07 b	16,33 b	22,24
Acrosoma no intacto (%)	46,12 b	62,92 a	83,67 a	12,39

**Nota.** Los valores se expresan como medias aritméticas. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticas significativas entre grupos, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Índice de linealidad espermática (LIN)

La Figura 1 evidencia que la linealidad (LIN) difirió entre tratamientos y aumentó de manera consistente conforme se prolongó el tiempo de descongelación. El mayor valor se registró en T3 (0,52), siendo superior a T1 (0,41) y estadísticamente comparable a T2 (0,47), lo que confirma un incremento gradual de este parámetro entre el tratamiento más corto y el más prolongado.

En términos cuantitativos, el aumento de LIN desde T1 a T3 representa una variación marcada en el patrón de desplazamiento, evidenciando que, bajo tiempos más prolongados de exposición a 37 °C, la fracción móvil tiende a exhibir trayectorias más lineales. Estos resultados describen una tendencia lineal positiva, lo que indica que el incremento del tiempo de exposición se asocia con un movimiento progresivamente más orientado y menos curvilíneo dentro de la población espermática evaluada.

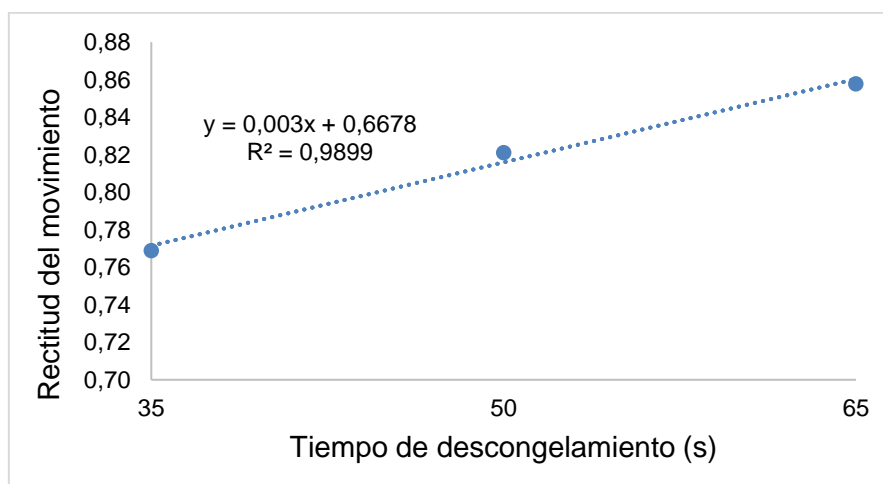


**Figura 1.**

Índice de linealidad (LIN) de espermatozoides en semen criopreservado de toros *Bos indicus* sometido a tratamientos de tiempo de descongelamiento a 37 °C (T1–T3). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Rectitud del trayecto espermático (STR)

De manera concordante con LIN, la Figura 2 muestra que la rectitud del movimiento (STR) presentó diferencias significativas ( $p = 0,0186$ ) y un incremento sostenido con el aumento del tiempo de descongelación. El tratamiento T3 alcanzó el valor más alto (0,86), superando a T1 (0,77) y sin diferir de T2 (0,82).

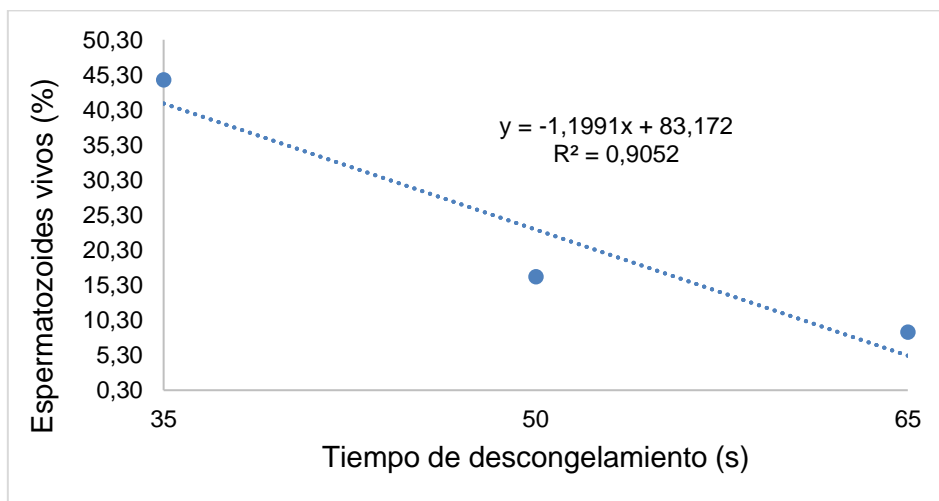


**Figura 2.**

Índice de rectitud del movimiento (STR) de espermatozoides en semen criopreservado de toros *Bos indicus* sometido a tratamientos de tiempo de descongelamiento a 37 °C (T1–T3). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (n = 3). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**3.5. Viabilidad espermática**

La Figura 3 demuestra que el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó de forma marcada al aumentar el tiempo de descongelación, con diferencias altamente significativas entre tratamientos y un comportamiento consistente con una tendencia lineal negativa. Este resultado indica que exposiciones más prolongadas a 37 °C se asocian con una pérdida acelerada de viabilidad, evidenciando mayor compromiso de la membrana plasmática en condiciones de descongelación.

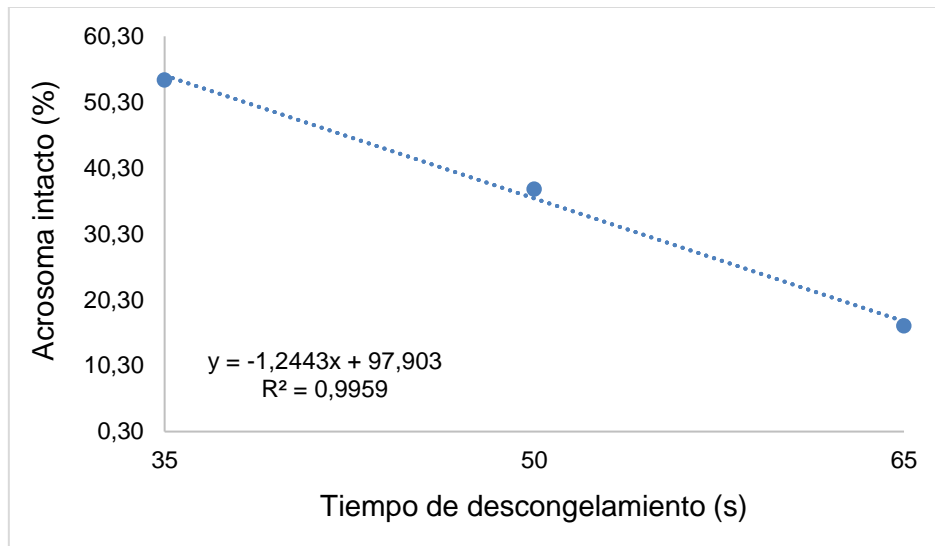
**Figura 3.**

Viabilidad espermática (porcentaje de espermatozoides vivos) en semen criopreservado de toros *Bos indicus* sometido a tres tratamientos de tiempo de descongelamiento a 37 °C (T1–T3). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar (n = 3). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**3.6. Integridad acrosomal**

En relación con la integridad estructural, la Figura 4 muestra que el porcentaje de acrosoma intacto presentó diferencias altamente significativas ( $p = 0,0036$ ) y una disminución progresiva conforme se incrementó el tiempo de descongelación. El valor máximo se registró con 35 s (53,66%), mientras que con 65 s se observó una reducción pronunciada, lo que sugiere un aumento del daño acrosomal bajo exposiciones prolongadas. En términos funcionales, esta caída en acrosoma intacto respalda que tiempos más largos comprometen componentes críticos del potencial fecundante, aun

cuando algunos descriptores geométricos del movimiento (LIN y STR) tiendan a incrementarse.



**Figura 4.**

Integridad acrosomal (porcentaje de acrosoma intacto) en semen criopreservado de toros *Bos indicus* sometido a tres tratamientos de tiempo de descongelamiento a 37 °C (T1–T3). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que, dentro del rango evaluado, el tiempo de descongelación afecta con mayor sensibilidad la integridad estructural del espermatozoide, membrana plasmática y acrosoma, mientras que las variaciones en motilidad total y progresiva fueron relativamente discretas (Castro et al., 2025). En este sentido, Solís et al. (2024) señalan que, cuando la exposición térmica se mantiene dentro de un intervalo operativo, el movimiento post-descongelación puede conservarse sin cambios marcados. Bajo 37 °C, el tratamiento T1 (35 s) presentó la mayor motilidad total (45,03%) y una motilidad progresiva comparable a T2 y T3, sin diferencias significativas, lo que refuerza la idea de que la motilidad aislada no siempre es el indicador más sensible ante ajustes moderados del protocolo (Đuračka et al., 2023).

Al analizar la cinemática mediante CASA, la mayoría de variables no mostró diferencias estadísticas; sin embargo, el patrón general fue consistente con un mejor desempeño funcional en el tiempo corto, especialmente en indicadores de vigor como VCL, cuyo valor máximo se observó en 35 s (Araya-Zúñiga et al., 2023). Esto es importante porque mayores velocidades curvilíneas suelen tener una fracción móvil con mayor actividad flagelar inmediatamente después de la descongelación, condición que puede deteriorarse a medida que aumenta el estrés térmico y oxidativo durante la recuperación metabólica (Maria & Norsvin, 2022).

Un resultado particularmente llamativo fue el incremento significativo de LIN y STR al prolongar el tiempo de descongelación, alcanzando los mayores valores en 65 s (Yadav et al., 2023). Aunque este comportamiento podría interpretarse inicialmente como una mejora de progresividad, Singh et al. (2022) advierten que debe evaluarse en conjunto con el resto del perfil funcional. En este contexto, la mayor rectitud puede explicarse por un efecto de “selección” de subpoblaciones sobrevivientes con trayectorias más rectilíneas, mientras se pierde una fracción considerable de células por daño de membrana.

La variable más sensible y decisiva fue la viabilidad, la cual disminuyó de manera marcada conforme aumentó el tiempo de exposición. Kamboj et al. (2025) reportan que la viabilidad posterior a la descongelación tiende a ser uno de los mejores predictores del daño funcional, especialmente cuando se incrementa la agresión térmica. En el presente estudio, el porcentaje de espermatozoides vivos cayó de 44,56% (35 s) a 16,49% y 8,59% en 50–65 s, con un incremento paralelo de mortalidad hasta 91,41% en 65 s. Este comportamiento sugiere que exposiciones prolongadas a 37 °C, más allá de facilitar el descongelamiento, aceleran procesos de daño como desestabilización lipídica, pérdida de fluidez y ruptura funcional de membranas, asociados a estrés oxidativo y agotamiento energético (Berean et al., 2024).

De manera concordante, la integridad acrosomal disminuyó de forma marcada con el incremento del tiempo: 53,66% de acrosoma intacto en 35 s frente a 16,33% en 65 s, con aumento del acrosoma no intacto hasta 83,67%. Danso et al. (2024) destacan que el acrosoma es un determinante directo de la capacidad de fecundación, por lo que su alteración reduce la probabilidad de una reacción acrosómica adecuada y una interacción eficiente con el ovocito, incluso cuando aún se observa motilidad. Además, Capela et al. (2022) señalan que la calidad final depende del balance entre una descongelación suficientemente rápida y la “sobrexposición” térmica, lo cual coincide con el deterioro acrosomal observado a medida que se prolongó el tiempo.

En conjunto, al integrar motilidad, cinemática, viabilidad y acrosoma, los resultados sostienen que 35 s a 37 °C ofrece el mejor equilibrio dentro del rango probado: mantiene motilidad total comparable, conserva mejor el vigor cinemático y, sobre todo, preserva significativamente la viabilidad y la integridad acrosomal, componentes estrechamente vinculados con el potencial fecundante. Podgrajsek et al. (2024) indican que, en condiciones de campo, la descongelación suele realizarse alrededor de 35–38 °C por tiempos cercanos o superiores a 30 s, evitando prolongaciones innecesarias; este criterio es consistente con la evidencia generada en el presente estudio (Liu et al., 2025).

Entre las principales limitaciones del presente estudio se encuentran el tamaño muestral, el número de repeticiones experimentales y la ausencia de validación mediante indicadores reproductivos *in vivo*, aspectos comunes en evaluaciones de semen criopreservado. Del Prete et al. (2022) indican que, aunque el análisis computarizado de semen (CASA) permite una evaluación objetiva y reproducible de la motilidad y la cinética espermática, su desempeño depende de variables operativas como la temperatura de análisis, la calibración del equipo y la configuración del software (García-Molina et al., 2023).

En este contexto, futuras investigaciones deberían integrar los parámetros espermáticos con tasas de fertilidad y desempeño embrionario, especialmente en sistemas productivos con predominio de *Bos indicus*. Por otra parte, la optimización de los protocolos de descongelación, adaptados a condiciones productivas regionales, puede mejorar la eficiencia reproductiva y reducir pérdidas económicas, beneficiando directamente a centros de inseminación artificial, productores ganaderos, técnicos reproductivos y programas de mejoramiento genético (Leite et al., 2022)

## 5. CONCLUSIONES

El tiempo de descongelación es un punto crítico de manejo porque influye directamente en la estabilidad celular, por lo que su control y estandarización son necesarios para asegurar calidad reproductiva consistente en programas de inseminación artificial.

En las condiciones evaluadas, una descongelación breve a 37 °C se perfila como la alternativa más adecuada para conservar estructuras esenciales para la fecundación, priorizando la funcionalidad biológica del eyaculado más allá de la movilidad observable.

La implementación de un protocolo uniforme de descongelación, acompañado de capacitación del personal y verificación periódica del procedimiento, puede reducir variabilidad operativa y contribuir a mejorar la eficiencia reproductiva en escenarios de campo.

**Contribución de los autores:** Conceptualización, AVC-M. y GAS-C.; metodología, AVC-M., GAS-C. y OCV-S.; software, CAG-R.; validación, OCV-S.; análisis formal, GAS-C.; investigación, GAS-C. y OCV-S.; recursos, AVC-M.; curación de datos, CAG-R.; redacción, preparación del borrador original, GAS-C.; redacción, revisión y edición, AVC-M. y OCV-S.; visualización, CAG-R.; supervisión, AVC-M.; administración del proyecto, GAS-C.; adquisición de financiamiento, GAS-C

**Financiamiento:** Esta investigación no recibió financiación externa.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) por el apoyo institucional brindado para la ejecución de este estudio. Asimismo, se reconoce al personal técnico de los laboratorios donde se desarrollaron los procedimientos experimentales por su asistencia en la preparación de materiales, el manejo de equipos y la estandarización de las evaluaciones de calidad espermática mediante CASA y técnicas de tinción (Eosina–Nigrosina y Giemsa). Se agradece también a los estudiantes que colaboraron en las actividades de laboratorio y en el registro de datos para el análisis estadístico. Finalmente, los autores expresan su gratitud a los revisores anónimos por sus observaciones y sugerencias, las cuales contribuyeron a fortalecer la calidad del manuscrito.

**Declaración de disponibilidad de datos:** Los datos generados y analizados durante el presente estudio están disponibles por parte del autor de correspondencia: [rbastidase@uteq.edu.ec](mailto:rbastidase@uteq.edu.ec)

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Araya-Zúñiga, I., Sevilla, F., Molina-Montero, R., Roldan, E. R. S., Barrientos-Morales, M., Silvestre, M. A., & Valverde, A. (2023). Kinematic and Morphometric Assessment of Fresh Semen, before, during and after Mating Period in Brahman Bulls. *Animals*, 14(1), 132. <https://doi.org/10.3390/ani14010132>
- Berean, D. I., Bogdan, L. M., & Cimpean, R. (2024). Advancements in Understanding and Enhancing Antioxidant-Mediated Sperm Cryopreservation in Small Ruminants: Challenges and Perspectives. *Antioxidants*, 13(6), 624. <https://doi.org/10.3390/antiox13060624>
- Capela, L., Leites, I., Romão, R., Lopes-Da-Costa, L., & Pereira, R. M. L. N. (2022). Impact of Heat Stress on Bovine Sperm Quality and Competence. *Animals*, 12(8), 975. <https://doi.org/10.3390/ani12080975>
- Castro, M., Leal, K., Pezo, F., & Contreras, M. J. (2025). Sperm Membrane: Molecular Implications and Strategies for Cryopreservation in Productive Species. *Animals*, 15(12), 1808. <https://doi.org/10.3390/ani15121808>
- Danso, F., Iddrisu, L., Lungu, S. E., Zhou, G., & Ju, X. (2024). Effects of Heat Stress on Goat Production and Mitigating Strategies: A Review. *Animals*, 14(12), 1793. <https://doi.org/10.3390/ani14121793>
- Del Prete, C., Prieto, O. B., Mislei, B., Iacono, E., Mari, G., Cocchia, N., Gasparini, B., Merlo, B., & Bucci, D. (2022). Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. *Animal Reproduction Science*, 247, 107089. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107089>
- Đuračka, M., Benko, F., & Tvrdá, E. (2023). Molecular Markers: A New Paradigm in the Prediction of Sperm Freezability. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(4), 3379. <https://doi.org/10.3390/ijms24043379>
- Engdawork, A., Belayhun, T., & Aseged, T. (2024). The Role of Reproductive Technologies and Cryopreservation of Genetic Materials in the Conservation of Animal Genetic Resources. *Ecological Genetics And Genomics*, 31, 100250. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2024.100250>
- García-Molina, A., Navarro, N., Cerveró, C., Sadeghi, S., Valverde, A., Roldan, E. R., Bompard, D., Garrido, N., & Soler, C. (2023). Effect of incubation and analysis temperatures on sperm kinematics and morphometrics during human semen analysis. *Revista Internacional de Andrología*, 21(2), 100350. <https://doi.org/10.1016/j.androl.2023.100350>
- Gupta, V. K., Mohanty, T. K., Bhakat, M., Kumaresan, A., Baithalu, R. K., Kumar, N., Dewry, R. K., Nain, D., Yadav, R., Arunkumar, R., & Soe, A. (2025). Effect of age-associated oxidative stress on sperm viability, acrosomal integrity and sperm apoptosis and DNA fragmentation in Sahiwal breeding bulls. *Veterinary Research Communications*, 49(2), 71. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10633-4>
- Kamboj, P., Kumar, A., Honparkhe, M., & Kaur, S. (2025). Effect of Reducing Sperm Number Per Insemination on Post Thaw Semen Quality and Fertility in Crossbred Cows. *The Indian Journal Of Animal Reproduction*, 46(3), 64-70. <https://doi.org/10.48165/ijar.2025.46.03.9>
- Koch, J., Weber, L. P., Heppelmann, M., Freise, F., Klingelmann, M., & Bachmann, L. (2022). Effect of Different Thawing Methods for Frozen Bull Semen and

- Additional Factors on the Conception Rate of Dairy Cows in Artificial Insemination. *Animals*, 12(18), 2330. <https://doi.org/10.3390/ani12182330>
- Leite, R. F., De Agostini Losano, J. D., Kawai, G. K. V., Rui, B. R., Nagai, K. K., Castiglioni, V. C., Siqueira, A. F. P., Assumpção, M. E. o. D., Baruselli, P. S., & Nichi, M. (2022). Sperm function and oxidative status: Effect on fertility in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls when semen is used for fixed-time artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 237, 106922. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106922>
- Liu, Z., Han, C., Wang, L., Cao, H., Xu, Z., & Wang, J. (2025). Nature-Inspired Multidisciplinary Strategies for Tissue and Organ Cryopreservation. *Advanced Materials*, 37(51), e10982. <https://doi.org/10.1002/adma.202510982>
- Maria, S. A., & Norsvin, T. (2022). The Development of Methods to Improve *In Vitro* Embryo Production in Pigs and Cattle. *Kent Academic Repository (University Of Kent)*. <https://doi.org/10.22024/unikent/01.02.104476>
- Mofadel, H. A., Hussein, H. A., Abd-Elhafee, H. H., & El-Sherry, T. M. (2024). Impact of various cryo-preservation steps on sperm rheotaxis and sperm kinematics in bull. *Scientific Reports*, 14(1), 11403. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61617-y>
- Montero-De-La-Cueva, J. V. (2023). Avances contemporáneos en la mejora genética bovina frente a los desafíos y perspectivas en el sector zootécnico. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 1(3), 14-24. <https://doi.org/10.70881/mcj/v1/n3/18>
- Neubert, M. L., Henneberg, S., Riedel, A., Schulze, Y., Hürland, M., Osmers, J. H., Wesenauer, C., Jung, M., Bajcsy, Á. C., & Schulze, M. (2025). Improving long-term storage of liquid-preserved bovine semen: Effect of extender, cooling protocol and holding temperature on sperm quality and fertility. *Theriogenology*, 249, 117604. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117604>
- Poclín-Rojas, A. Y., Barnechea, M. D. A., Portocarrero, G. T. S., Ampuero-Trigoso, G., Carrillo, D. B., Depaz-Hizo, B. A., Vásquez-Tarrillo, R. W., Diaz-Quevedo, C., & Quispe-Ccasa, H. A. (2025). Motility Performance of Thawed Spermatozoa of Bulls from the Tropics Throughout the Year. *Animals*, 15(16), 2451. <https://doi.org/10.3390/ani15162451>
- Podgrajsek, R., Bolha, L., Pungert, T., Pizem, J., Jazbec, K., Malicev, E., & Stimpfel, M. (2024). Effects of Slow Freezing and Vitrification of Human Semen on Post-Thaw Semen Quality and miRNA Expression. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(8), 4157. <https://doi.org/10.3390/ijms25084157>
- Ruthrakumar, R., Sabarinathan, M., Dhanush, M., Kalaiyarasan, V., Gopikrishnan, D., Palanisamy, M., & Selvaraju, M. (2024). Effectiveness of Giemsa and Modified Trypan Blue-Giemsa Staining for the Assessment of Acrosome Integrity in Bull and Buck semen. *The Indian Journal Of Animal Reproduction*, 45(1), 53-57. <https://doi.org/10.48165/ijar.2024.45.01.12>
- Serafini, S., Pranov, E., Bauer, K. T., Onochie, C., & O'Flaherty, C. (2025). Deoxycholic Acid Impairs Human Sperm Quality and Function Through Oxidative Stress-Driven Damage. *Antioxidants*, 14(11), 1271. <https://doi.org/10.3390/antiox14111271>
- Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, 12(23), 3271. <https://doi.org/10.3390/ani12233271>

- Singh, P., Bedi, M. K., Singhal, S., Singh, A. K., Kumar, A., & Honparkhe, M. (2022). Effect of graphene oxide as cryoprotectant on post-thaw sperm functional and kinetic parameters of cross bred (HF X Sahiwal) and Murrah buffalo ( ) bulls. *Cryobiology*, 106, 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.03.002>
- Solís, J. M., Sevilla, F., Silvestre, M. A., Araya-Zúñiga, I., Roldan, E. R. S., Saborío-Montero, A., & Valverde, A. (2024). Effect of Thawing Procedure and Thermo-Resistance Test on Sperm Motility and Kinematics Patterns in Two Bovine Breeds. *Animals*, 14(19), 2768. <https://doi.org/10.3390/ani14192768>
- Wang, W., Wang, W., Wang, P., Wang, X., Wang, L., Wang, C., Zhang, C., & Huo, Z. (2023). Impact of straw return on soil temperature and water during the freeze-thaw period. *Agricultural Water Management*, 282, 108292. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2023.108292>
- WiJaya, F. M. P., Sutopo, S., Samsudewa, D., SetiYono, A., & SetiAji, A. (2023). Fresh Semen Quality of *Bos taurus*, *Bos indicus* and *Bos sondaicus* Bulls in the Tropical Condition. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 33(3), 420-428. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.1244506>
- Yadav, P., Kumar, D., Saini, M., Sharma, R., Dua, S., Selokar, N. L., Bansal, S., Punetha, M., Gupta, A., Kumar, R., & Kumar, P. (2023). Evaluation of postnatal growth, hematology, telomere length and semen attributes of multiple clones and re-clone of superior buffalo breeding bulls. *Theriogenology*, 213, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.024>