

Heterogeneidad del eyaculado y criotolerancia para optimizar la reproducción asistida en especies ganaderas y silvestres

Francisco Sevilla

Escuela de Agronomía
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
✉ f.sevilla@itcr.ac.cr

Sayleen Rojas-Valerio

Escuela de Agronomía
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
✉ sarojas@itcr.ac.cr

Ignacio Araya-Zúñiga

Estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología
para la Sostenibilidad (DOCINADE)
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
✉ igaraya@estudiantec.cr

Eduardo R.S. Roldan

Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC),
Madrid, España
✉ roldane@mncn.csic.es

Itsel Murillo

Escuela de Agronomía
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
✉ imurillo@itcr.ac.cr

Anthony Valverde

Escuela de Agronomía
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
✉ anvalverde@itcr.ac.cr

Fecha de recepción: 22 de agosto 2025 | Fecha de aprobación: 6 de abril del 2026

Resumen

La fertilidad de los machos reproductores es una variable fundamental para la sostenibilidad de los sistemas pecuarios, los programas de mejora genética y la conservación *ex-situ* (*fuera de un ambiente natural*) de recursos genéticos de animales. Durante el 2024-2025, el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC), elaboró ocho artículos originales que abarcan desde el almacenamiento a corto plazo del semen hasta los efectos de la criopreservación y la dinámica de subpoblaciones espermáticas. El presente trabajo integra críticamente esos hallazgos. Se sintetizan factores intrínsecos (edad, competencia espermática) y extrínsecos (dilución, tiempo de almacenamiento) que modulan la calidad seminal fresca; alteraciones estructurales y funcionales inducidas por la criopreservación en verracos, bovinos lecheros y alpacas; la utilidad de los sistemas CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*) y de los análisis multivariantes para entender cómo se agrupan los espermatozoides, considerando su movimiento y sus características de forma y tamaño; y las implicaciones prácticas para la inseminación artificial, la selección de reproductores y la creación de biobancos. Se discuten retos metodológicos, de estandarización de protocolos, la necesidad de integrar aspectos relacionados con la actividad química y movimiento de los espermatozoides, lo que propone líneas futuras orientadas a la incorporación de algoritmos de aprendizaje automático y a la evaluación funcional de subpoblaciones espermáticas definidas *in vitro* para hacer "andrología de precisión".

Palabras clave: CASA, criopreservación, subpoblaciones espermáticas, verraco, bovino, alpaca, fertilidad.

Abstract

The fertility of breeding males is a key variable for the sustainability of livestock systems, genetic improvement programs, and the *ex-situ* conservation of zoogenetic resources. Over the past two years, Animal Reproduction Laboratory (AndroTEC) has drafted eight original articles covering topics ranging from short-term semen storage to the effects of cryopreservation and the dynamics of sperm subpopulations. This article critically integrates those findings. It synthesizes: intrinsic factors (e.g., age, sperm competitiveness) and extrinsic factors (e.g., dilution, storage time) that modulate fresh semen quality; structural and functional alterations induced by cryopreservation in boars, dairy bulls, and alpacas; the usefulness of CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) systems and multivariate analyses to understand the distribution of kinematic and morphometric sperm subpopulations within the ejaculate; and practical implications for artificial insemination, sire selection, and biobank development. Methodological challenges, protocol standardization, and the need for biochemical-kinematic integrative approaches are discussed. Future directions include the incorporation of machine learning algorithms and the functional assessment of *in vitro* defined sperm subpopulations as a step toward "precision andrology."

Keywords: CASA, cryopreservation, sperm subpopulations, boar, bovine, alpaca, epididymal maturation, fertility.

Introducción

La fertilidad de las especies ganaderas utilizadas para obtención de proteína animal sostiene gran parte de la seguridad alimentaria mundial, impulsa programas de mejora genética y, en el ámbito biomédico, ofrece modelos base para comprender la reproducción de los mamíferos [1], [2]. Por ello, se requieren metodologías robustas para evaluar y conservar la calidad del semen [3]. Sin embargo, existen factores intrínsecos (internos) y extrínsecos (externos) que afectan a los espermatozoides; la capacidad de fecundar está condicionada por la edad del macho [4], [5], el medio ambiente [6], la maduración en el ambiente epididimario (estructura donde se almacenan y se maduran los espermatozoides) [7], las prácticas de almacenamiento y el estrés fisicoquímico asociado a la criopreservación [8]. Frente a estos retos, la aparición de los sistemas computarizados de análisis seminal, CASA systems (*Computer-Assisted Semen Analysis*) y los avances bioinformáticos permiten analizar con objetividad cientos de miles de datos cinemáticos y morfométricos [9], [10], detectar subpoblaciones funcionales [11] y más recientemente, integrar algoritmos de *machine learning*, como una técnica que permite a las computadoras aprender de los datos y encontrar patrones, que permitan explorar dinámicas celulares complejas [12].

La evaluación de la movilidad y cinética de los espermatozoides sigue siendo junto con la concentración espermática, los criterios más importantes para la evaluación de la calidad seminal [13], [14]. Sin embargo, más allá de la movilidad total de una muestra de semen, la heterogeneidad intrínseca del eyaculado condiciona la capacidad fecundante y la criotolerancia de los espermatozoides, por lo que se debe estudiar con más detalle [15], [16]. La combinación de sistemas CASA con herramientas multivariantes ha permitido identificar subpoblaciones funcionales y establecer vínculos con la fertilidad [17], [18], [19]. Paralelamente, la criobiología continúa estudiando la capacidad de los medios de dilución empleados en la crioconservación de gametos, las tasas de enfriamiento y protocolos de descongelación [20].

Los espermatozoides son células altamente especializadas y, al mismo tiempo, extremadamente sensibles a variaciones térmicas, osmóticas y oxidativas [21]. Estas variaciones deben ser estudiadas con el objetivo de proponer protocolos optimizados de evaluación espermática que garanticen la reproducibilidad de los resultados [20]. Aunque el análisis seminal tradicional resume la calidad en porcentajes de movilidad, viabilidad o morfología normal, cada eyaculado es en realidad una población heterogénea de subconjuntos celulares con comportamientos cinéticos, bioquímicos y morfométricos propios y mediante la tecnología CASA se ha podido cuantificar esa heterogeneidad con objetividad y reproducibilidad [22], [23].

Por esto, el proyecto de investigación "Protaminas: Evolución y papel en la protección del ADN espermático, formación de la cabeza y funcionamiento celular (PROTASPERM) y que se divulga a partir del presente artículo, tuvo como propósito investigar la formación de gametos masculinos desde la espermatogénesis hasta la conservación, así como los factores que influyen sobre la calidad seminal, que resume el trabajo de ocho trabajos desarrollados y publicados entre 2022 y 2025 en revistas académicas indexadas. Cada hallazgo de este proyecto fue documentado y se presenta en este artículo, así como los retos a futuro, para mejorar nuestro entendimiento actual de la reproducción animal en zootecnia y biología de la conservación.

Metodología

La caracterización integral de la calidad seminal y la conservación requiere de tecnologías avanzadas de análisis de imagen, estadística multivariante y protocolos estandarizados de criobiología, así como la determinación a algunos de los efectos de la crioconservación.

Por esto, primero, se utilizaron sistemas dedicados al análisis de la movilidad de los espermatozoides (CASA-Mot) y la forma y tamaño de estos (CASA-Morph), que producen mediciones objetivas y reproducibles de parámetros del movimiento como la movilidad total de los espermatozoides en una muestra (TM, %) y/o que tan progresivos se desplazan (PM, %). Además, estos sistemas generan valiosa información sobre las velocidades que tienen los espermatozoides y si estos movimientos presentan algunos patrones específicos. Finalmente, se analizan características de tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides, como el área, perímetro, ancho y longitud, y otros parámetros con respecto a su forma.

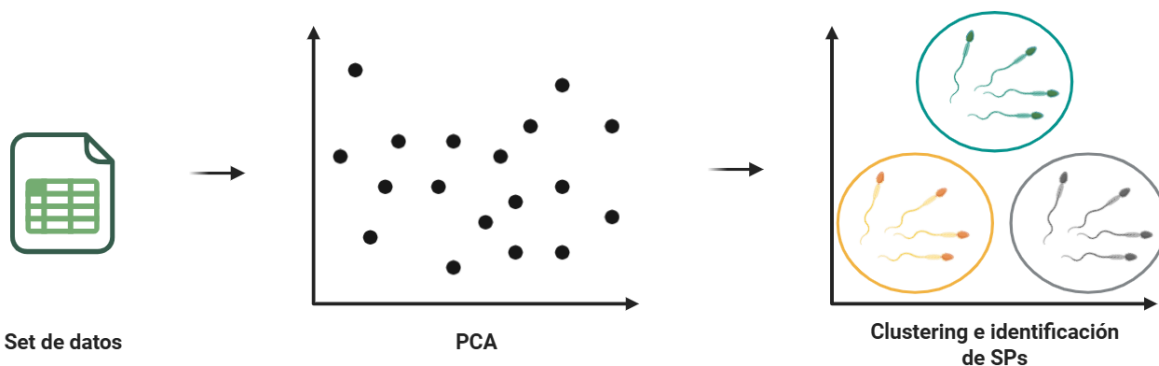


Figura 1. Análisis de los datos obtenidos por la tecnología CASA-Mot o CASA-Morph en búsqueda de patrones de distribución en los espermatozoides. PCA = análisis de componentes principales. SPs = subpoblaciones. Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a los estudios de la criopreservación, se utilizan diferentes medios o diluyentes que son añadidos al semen y utilizados en los procesos de conservación seminal. Para estos procesos, también es necesario utilizar procesos controlados de congelación y descongelación que permitan mantener las características óptimas de los espermatozoides posterior a esos procesos. Existen diferentes técnicas de análisis de los efectos sobre los espermatozoides al someterse a procesos de conservación seminal, algunos de estos requieren de mayor tecnicidad y equipo tecnológico. En este estudio se analizó la integridad de las membranas de los espermatozoides y un ensayo para el análisis de la fragmentación del ADN del núcleo espermático, complementando las pruebas de movilidad y cinética, con el propósito de obtener más información sobre el perfil estructural y la funcionalidad de los espermatozoides.

Además, las imágenes de espermatozoides en distintas fases de maduración (espermátidas en distintas fases de la espermiogénesis; proceso de formación y maduración de los espermatozoides) se analizaron

con algoritmos de aprendizaje automático (*PCA* y *análisis discriminante lineal, LDA*). Esta técnica permitió clasificar automáticamente los estados de maduración y determinar rasgos morfológicos sutiles, promoviendo herramientas diagnósticas novedosas para la “andrológica de precisión” basadas en visión por computadora e inteligencia artificial. Los datos generados se sometieron a análisis multivariante y de subpoblaciones (técnica para la identificación grupos de espermatozoides con características similares dentro de una muestra) mediante análisis de componentes principales (*PCA*), algoritmos de agrupamiento (*k-medias*) y modelos mixtos de análisis estadístico (*clustering*). Estos enfoques permitieron identificar subpoblaciones (SPs) o agrupaciones de espermatozoides (Figura 1).

Principales hallazgos del proyecto

Factores que afectan la calidad del semen refrigerado en la especie porcina

El primer estudio es descrito en la Figura 2 y fue desarrollado por León et al., y demostró que tasas de dilución bajas, como una dilución 1:1 (vol semen : vol diluyente) y el almacenamiento a 17 °C mantienen la movilidad total de los espermatozoides en su nivel más alto y minimizan la presencia morfoanomalías hasta las 48 h en la especie porcina; en cambio, utilizar diluciones más altas de 1:4 (vol semen:vol diluyente) o mayores, afectan los patrones del movimiento de los espermatozoides y favorecen la pérdida de la viabilidad de estos. Estudios posteriores sobre el manejo pos-eyaculatorio con Androstar® Plus confirmaron estos hallazgos: la refrigeración a 17 °C con dilución 1:1 (vol semen:vol diluyente) mantiene ~ 85 % de movilidad total durante 96 h, mientras que diluciones mayores de 1:8 a 1:16 (vol semen:vol diluyente) afectan la velocidad espermática, lo que provoca un aumento de espermatozoides más lentos [24].

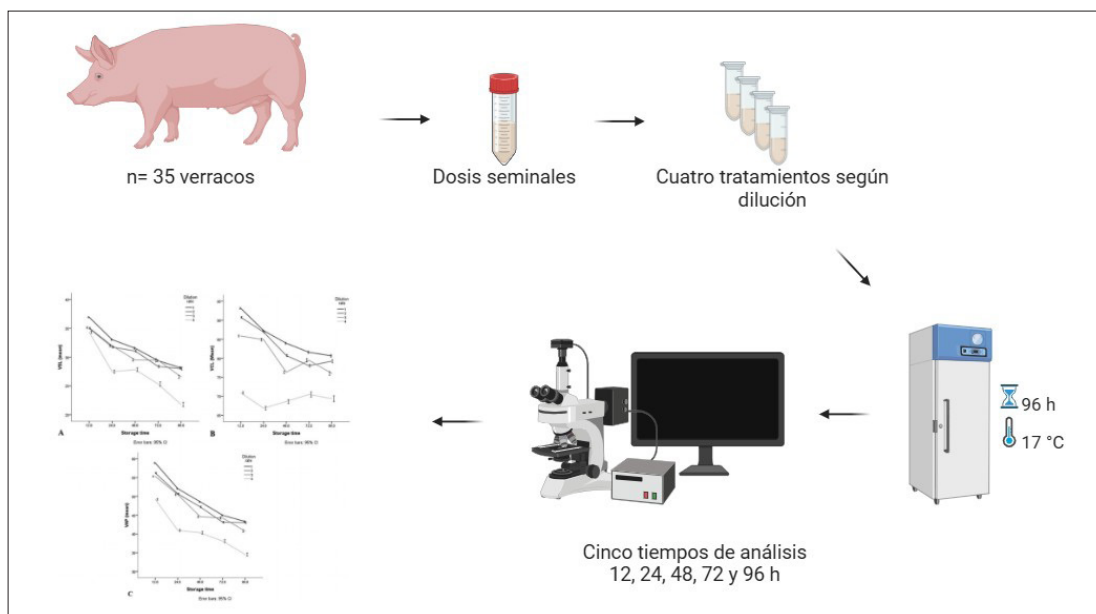


Figura 2. Estudio de la relación de tasa dilución y la temperatura de almacenamiento de las dosis seminales de verraco sobre la calidad seminal. Fuente: Elaboración propia.

Efecto de la criopreservación sobre la funcionalidad espermática

Además, Sevilla et al. demostraron que, al descongelar dosis de espermatozoides de la especie porcina, la calidad de estas podría estar influenciada por la calidad inicial de los eyaculados utilizados previo al proceso de congelación. Esto se demostró, debido a que en los tratamientos donde la proporción de espermatozoides viables previo a la congelación era mayor, la integridad y calidad de estos fue mayor, y además se presentó menor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan daños a la membrana de los espermatozoides por oxidación [25].

Efecto de la edad en la especie bovina (Brahman)

El estudio realizado por Araya-Zúñiga et al. analizó 31 eyaculados con los módulos CASA-Mot y CASA-Morph (Figura 3). Los resultados mostraron que los toros jóvenes (≤ 31 meses) presentan valores significativamente más altos de velocidades de los espermatozoides (VCL, VSL y VAP), mientras que los adultos (> 31 meses) exhiben trayectorias más lineales, mayor elongación nuclear y cabezas más elípticas. Por medio del análisis multivariante se identificaron cuatro agrupaciones cinemáticas cuya distribución depende de la edad, lo que respalda la recomendación de ajustar los programas de inseminación artificial y de selección genética según la edad reproductiva óptima de la raza [5].

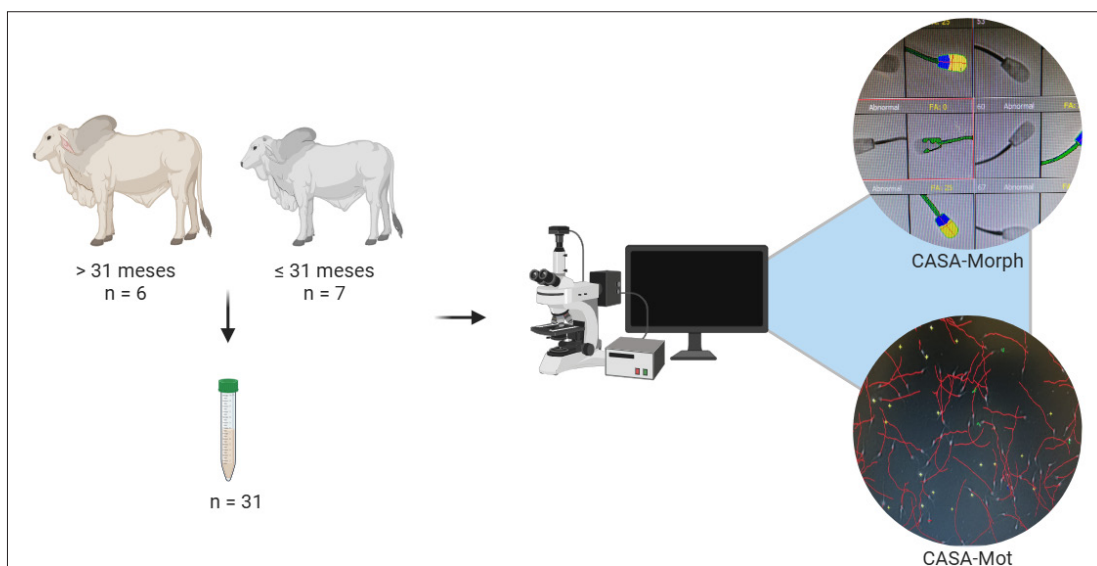


Figura 3. Análisis de la edad de la raza Brahman sobre la cinética y morfometría espermática. Fuente: Elaboración propia.

Estructura subpoblacional cinemática en bovinos lecheros

En bovinos lecheros, Solís et al. compararon la cinemática de los espermatozoides de toros Holstein y Jersey después de la descongelación de dosis comerciales. Los eyaculados de toros Jersey conservaron porcentajes significativamente mayores de células rápidas y progresivas que los de toros Holstein. El análisis de SPs reveló que el clúster SP2 concentró los espermatozoides con mayor velocidad, atribuidos a un mayor potencial de fertilización, y se presentó con mayor frecuencia en la raza Jersey. Es necesario plantear estrategias de selección genética sobre características de calidad seminal y congelabilidad, además, de manejo pos-descongelación específicas para cada raza [11].

Se analizaron 72 dosis comerciales de semen de toros Holstein y Jersey. La Figura 4 muestra la metodología empleada para la preparación de las dosis seminales, el proceso de congelación y análisis. La cinemática espermática fue evaluada con CASA-Mot y la posterior clasificación mediante k-medias revelaron tres SPs claramente diferenciadas: SP1 (espermatozoides con movimiento lento), SP2 (espermatozoides con movimiento rápido) y SP3 (espermatozoides que mostraron patrones de velocidad intermedia). La raza Jersey presentó una proporción significativamente mayor de SP2 y, consecuentemente, una movilidad progresiva superior en comparación con la raza Holstein, lo que sugiere un mayor potencial fertilizante tras la criopreservación (Figura 4).



Figura 4. Estudio de la dinámica subpoblacional en bovinos lecheros de la raza Holstein y Jersey. Fuente: Solís et al. [11].

Alpaca como modelo altiplánico para análisis morfométrico

Ccalta et al. evidenciaron que, en alpacas, tanto la vía de obtención del eyaculado, por canulación de conductos deferentes o pos-cópula, como la criopreservación modifican de forma significativa la morfometría espermática [26]. Ambos factores alteran el tamaño y la forma de la cabeza del espermatozoide, provocando una redistribución de las cuatro SPs morfométricas originalmente descritas. Además, la congelación incrementa la variabilidad intra-eyaculado lo que complica la clasificación objetiva de los espermatozoides, y repercute en la selección de machos donantes para biobancos de germoplasma. Esto también compromete la eficiencia de los programas de conservación y reproducción asistida en camélidos altoandinos, donde la fertilidad ya es intrínsecamente baja.

Heterogeneidad intrínseca: subpoblaciones espermáticas y análisis multivariante

Los trabajos de León et al., Araya-Zúñiga et al. y Ccalta et al. convergen en el concepto de heterogeneidad espermática presente en los eyaculados de las especies domésticas y silvestres estudiadas [5, 24, 26]. El uso de metodologías multivariantes como el PCA y los algoritmos de agrupamiento cinemático y morfométrico permiten comprender la complejidad del eyaculado. Estos enfoques permiten identificar SPs con movilidad hiperactiva o con morfoanomalías que pasarían inadvertidas si se emplearan únicamente valores promedios. Además, facilitan la correlación entre la distribución de SPs y los parámetros de fertilidad tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que podría permitir la exploración de modelos predictivos más robustos.

Protaminación y caracterización de la formación espermática

Agudo-Ríos et al. desarrollaron modelos de aprendizaje automático que integra variables morfométricas nucleares con marcadores específicos de acrosoma y *manchette*, logrando clasificar de manera automática las etapas 8 a 16 de la espermiogénesis con una precisión superior al 97%. Esto constituye un avance significativo para estudios toxicológicos de alto rendimiento y para la detección temprana de alteraciones en la maduración espermática [27].

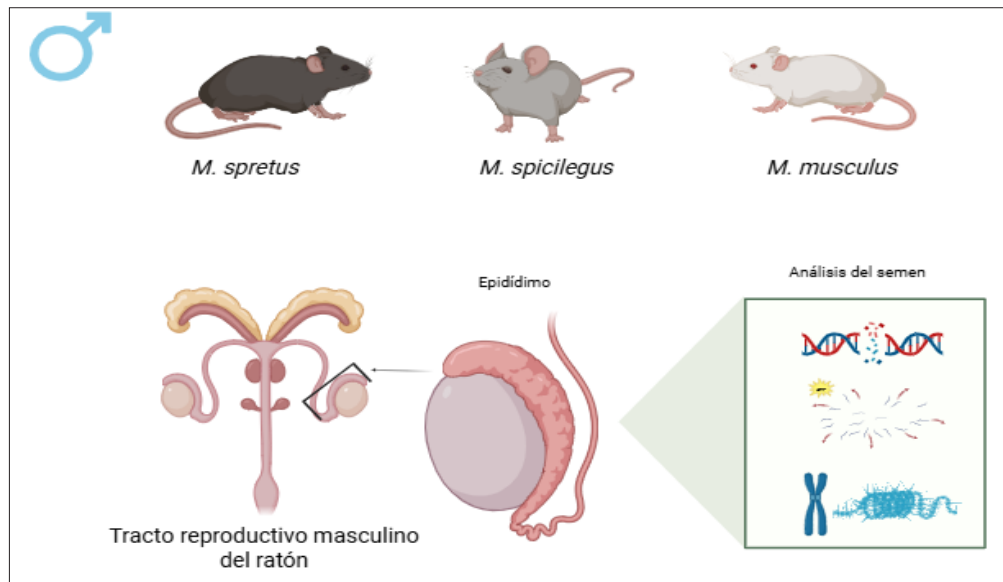


Figura 5. Estudio de la progresividad espermática, condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN espermático en tres especies del género *Mus*, recuperado de tres partes del epidídimo. Fuente: Elaboración propia.

En un segundo estudio, se abordó la maduración epididimaria desde una perspectiva comparada en tres especies del género *Mus* sometidas a diferentes niveles de presión de competencia espermática: *M. musculus*, *M. spretus* y *M. spicilegus*. Mediante el análisis del *caput* (cabeza), *corpus* (cuerpo) y *cauda* (cola) epididimarios, se caracterizó la adquisición progresiva de movilidad, la compactación acrosomal y la estabilidad del ADN (Figura 5). Los resultados mostraron un incremento continuo de movilidad y compactación de la cromatina a lo largo del tránsito epididimario, acompañado de una disminución de la fragmentación del ADN. Entre las especies, *M. spicilegus* presentó la cromatina más compacta y una mayor resistencia al estrés oxidativo, mientras que *M. musculus* exhibió la movilidad más baja y un patrón de maduración más tardío [27].

Conclusiones

Los protocolos de evaluación espermática deben considerar factores como la edad del macho, el método de colecta, la tasa de dilución y los procedimientos de criopreservación. Esto con el objetivo de maximizar la eficiencia reproductiva tanto en granjas comerciales como en programas de conservación mediante bancos de germoplasma (biobancos). Las nuevas herramientas de clasificación celular y análisis cuantitativo de SPs deben integrarse dentro de los laboratorios de reproducción animal, buscando evaluaciones objetivas y reproducibles.

Como resultado de este proyecto, se abren dos líneas de investigación a futuro. La primera es validar en estudios *in vivo*, la relación causal entre la distribución de SPs y el éxito de la fecundación. La segunda explora la modificación epigenética dirigida de los espermatozoides con el fin de incrementar su resiliencia a los procesos de enfriamiento y congelación, con el enfoque de "andrología de precisión" que permita optimizar la fertilidad y la conservación genética.

Referencias

- [1] I. BenSouf *et al.*, "Use of Natural Biomolecules in Animal Feed to Enhance Livestock Reproduction," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 26, no. 5, p. 2328, Mar. 2025, doi: 10.3390/IJMS26052328.
- [2] T. C. Davis and R. R. White, "Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security," *Theriogenology*, vol. 150, pp. 27–33, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.01.041.
- [3] B. M. Tanga *et al.*, "Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment – A review," *Anim. Biosci.*, vol. 34, no. 8, p. 1253, Aug. 2021, doi: 10.5713/AB.21.0072.
- [4] F. Sevilla *et al.*, "Effects of age, season, breed, and sperm counting chamber on boar semen quality variables in tropical conditions," *Austral J. Vet. Sci.*, vol. 57, p. e5701, Mar. 2025, doi: 10.4206/AJVS.57.01.
- [5] I. Araya-Zúñiga, F. Sevilla, D. Pichardo-Matamoros, A. Salamanca-Carreño, B. Domínguez-Mancera, and A. Valverde, "Effect of age on sperm motility, kinematics, and morphometrics in Brahman cattle," *Acta Veterinaria-Beograd*, vol. 75, no. 2, pp. 242–258, Jun. 2025, doi: 10.2478/acve-2025-0019.
- [6] J. Calderón-Calderón, F. Sevilla, E. R. S. Roldan, V. Barquero, and A. Valverde, "Influence of fat-soluble vitamin intramuscular supplementation on kinematic and morphometric sperm parameters of boar ejaculates," *Front. Vet. Sci.*, vol. 9, p. 908763, 2022, doi: 10.3389/FVETS.2022.908763.
- [7] M. Gutiérrez-Reinoso and M. García-Herreros, "Normozoospermic vs teratozoospermic domestic cats: differential testicular volume, sperm morphometry and subpopulation structure during epididymal maturation," *Asian J. Androl.*, vol. 18, no. 6, pp. 871–878, 2016, doi: 10.4103/1008-682X.187583.
- [8] I. Araya-Zúñiga, F. Sevilla, J. A. González, K. Matamoros, and A. Valverde, "La criopreservación del germoplasma de especies ganaderas: Un paso hacia la sostenibilidad," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 36, p. 61375, Feb. 2025, doi: 10.15517/AM.2025.61375.
- [9] M. T. Gallagher, D. J. Smith, and J. C. Kirkman-Brown, "CASA: tracking the past and plotting the future," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 30, no. 6, pp. 867–874, May 2018, doi: 10.1071/RD17420.
- [10] A. Valverde, V. Barquero, and C. Soler, "The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review," *J. Anim. Feed Sci.*, vol. 29, no. 3, pp. 189–198, Sep. 2020, doi: 10.22358/jafs/127691/2020.
- [11] J. M. Solís *et al.*, "Variaciones en la estructura subpoblacional cinemática del semen criopreservado de ganado lechero," *Agronomía Mesoamericana*, p. 63141, Jun. 2025, doi: 10.15517/AM.2025.63141.
- [12] S. Ottl, S. Amiriparian, M. Gerczuk, and B. W. Schuller, "motilitAI: A machine learning framework for automatic prediction of human sperm motility," *iScience*, vol. 25, no. 8, p. 104644, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.104644.
- [13] M. Van de Hoek, J. P. Rickard, and S. P. de Graaf, "Motility Assessment of Ram Spermatozoa," *Biology*, vol. 11, no. 12, p. 1715, Dec. 2022, doi: 10.3390/BIOLOGY11121715.
- [14] F. Sevilla, C. Soler, I. Araya-Zúñiga, V. Barquero, E. R. S. Roldan, and A. Valverde, "Are There Differences between Methods Used for the Objective Estimation of Boar Sperm Concentration and Motility?," *Animals*, vol. 13, no. 10, p. 1622, May 2023, doi: 10.3390/ANI13101622.
- [15] M. Ramón *et al.*, "Understanding Sperm Heterogeneity: Biological and Practical Implications," *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 49, pp. 30–36, Oct. 2014, doi: 10.1111/rda.12404.
- [16] S. A. Vasilescu *et al.*, "A microfluidic approach to rapid sperm recovery from heterogeneous cell suspensions," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-87046-9.

- [17] L. Viquez, V. Barquero, C. Soler, E. R. S. Roldan, and A. Valverde, "Kinematic Sub-Populations in Bull Spermatozoa: A Comparison of Classical and Bayesian Approaches," *Biology*, vol. 9, no. 6, p. 138, Jun. 2020, doi: 10.3390/biology9060138.
- [18] V. Barquero *et al.*, "Relationship between Fertility Traits and Kinematics in Clusters of Boar Ejaculates," *Biology*, vol. 10, no. 7, p. 595, Jul. 2021, doi: 10.3390/BIOLOGY10070595.
- [19] V. Barquero, E. R. S. Roldan, C. Soler, J. L. Yániz, M. Camacho, and A. Valverde, "Predictive Capacity of Boar Sperm Morphometry and Morphometric Sub-Populations on Reproductive Success after Artificial Insemination," *Animals*, vol. 11, no. 4, p. 920, Apr. 2021, doi: 10.3390/ANI11040920.
- [20] J. M. Solís *et al.*, "Effect of Thawing Procedure and Thermo-Resistance Test on Sperm Motility and Kinematics Patterns in Two Bovine Breeds," *Animals*, vol. 14, no. 19, p. 2768, Sep. 2024, doi: 10.3390/ANI14192768.
- [21] E. Pintus, J. Luis, R.- Santaella, J. R. Drevet, and R. Sorrentino, "Impact of Oxidative Stress on Male Reproduction in Domestic and Wild Animals," *Antioxidants*, vol. 10, no. 7, p. 1154, Jul. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10071154.
- [22] I. Araya-Zúñiga, F. Sevilla, V. Barquero, and A. Valverde, "The effect of extender, age, and bovine sexual status on the sperm kinematics," *Agronomía Mesoamericana*, p. 52597, Jul. 2023, doi: 10.15517/AM.2023.52597.
- [23] V. Barquero, C. Soler, F. Sevilla, J. Calderón-Calderón, and A. Valverde, "A Bayesian analysis of boar spermatozoa kinematics and head morphometrics and their relationship with litter size fertility variables," *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 56, no. 7, pp. 1024–1033, Jul. 2021, doi: 10.1111/RDA.13946.
- [24] J. León *et al.*, "Evaluating the effect of semen storage and dilution rate on boar sperm quality," *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 59–71, Jan. 2024, doi: 10.1080/09064702.2024.2430785
- [25] F. Sevilla, I. Araya-Zúñiga, K. Matamoros, M. Barrientos-Morales, R. Ccalta, and A. Valverde, "Efecto de la criopreservación del semen de verraco sobre la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide," *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 36, no. 3, p. e29166, Jun. 2025, doi: 10.15381/rivep.v36i3.29166.
- [26] R. Ccalta, F. Sevilla, I. Araya-Zúñiga, X. Mata, H. Cucho, and A. Valverde, "Dinámica subpoblacional del semen criopreservado de alpaca obtenido de conductos deferentes y post copula", *Arch. Zootec.* vol. 75, no.289, pp.6-16. 2026 (in press)
- [27] C. Agudo-Rios *et al.*, "Epididymal sperm maturation in mouse species with differing levels of sperm competition," *Biol. Reprod.*, vol. 114, no. 3, pp. 905–918, Dec. 2025, doi: 10.1093/BIOLRE/IOAF269.

Sobre los autores

Francisco Sevilla

Investigador de la Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. (<https://orcid.org/0000-0003-1480-4141>).

Ignacio Araya-Zúñiga

Estudiante de la Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad (DOCINADE) ITCR, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica. (<https://orcid.org/0000-0002-4292-2287>)

Itsel Murillo

Técnica de investigación de la Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. (<https://orcid.org/0000-0001-8039-5003>)

Sayleen Rojas-Valerio

Técnica de investigación de la Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. (<https://orcid.org/0009-0000-8067-4811>)

Eduardo R.S. Roldan

Investigador del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Madrid, España. (<https://orcid.org/0000-0002-7545-4248>)

Anthony Valverde

Investigador de la Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. (<https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>)