



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Maestría en Reproducción Animal con mención en Rumiantes

Efecto de la aplicación de diferentes niveles de cafeína sobre las características espermáticas en el semen crioconservado de carneros de pelo

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de Magíster en Reproducción Animal con mención en Rumiantes

AUTOR:

Ing. Erika Belen Pilamunga Llagua

DIRECTOR:

Dr. Edgar Lenin Aguirre Riofrio, PhD

Loja – Ecuador

2025



Universidad
Nacional
de Loja

**Sistema de Información Académico
Administrativo y Financiero - SIAAF**

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN Y APROBACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **AGUIRRE RIOFRIO EDGAR LENIN**, director del Trabajo de Titulación denominado **Efecto de la aplicación de diferentes niveles de cafeína sobre las características espermáticas en el semen criopreservado de carneros de pelo**, perteneciente al estudiante **ERIKA BELEN PILAMUNGA LLAGUA**, con cédula de identidad N° **2100923370**.

Certifico:

Que luego de haber dirigido el **Trabajo de Titulación**, habiendo realizado una revisión exhaustiva para prevenir y eliminar cualquier forma de plagio, garantizando la debida honestidad académica, se encuentra concluido, aprobado y está en condiciones para ser presentado ante las instancias correspondientes.

Es lo que puedo certificar en honor a la verdad, a fin de que, de así considerarlo pertinente, el/la señor/a docente de la asignatura de **Titulación**, proceda al registro del mismo en el Sistema de Gestión Académico como parte de los requisitos de acreditación de la Unidad de Titulación del mencionado estudiante.

Loja, 19 de Diciembre de 2024



Firmado electrónicamente por:
**EDGAR LENIN AGUIRRE
RIOFRIO**

F)
DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN



Certificado TIC/TT.: UNL-2024-003161

Autoría

Yo, **Erika Belen Pilamunga Llagua**, declaro ser autora del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:

Cédula de identidad: 2100923370

Fecha: 19 de diciembre de 2024

Correo electrónico: belenn_19@outlook.com

Teléfono: 0985188922

Carta de autorización por parte de la autora para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo del Trabajo de Titulación

Yo, **Erika Belen Pilamunga Llagua**, declaro ser autor del Trabajo de Titulación denominado: **Efecto de la aplicación de diferentes niveles de cafeína sobre las características espermáticas en el semen crioconservado de carneros de pelo**, como requisito para optar por el título de **Magister en Reproducción Animal con mención en Rumiantes**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 21 días del mes de abril de dos mil veinticinco.

Firma:

Autor/a: Erika Belen Pilamunga Llagua,

Cédula: 2100923370

Dirección: Nueva Loja, Ecuador

Correo electrónico: belenn_19@outlook.com

Teléfono: 0985188922

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director/a del Trabajo de Titulación: Mvz. Edgar Lenin Aguirre Riofrio. PhD

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a superar y dándome la oportunidad de seguir en mis estudios.

A mis queridos padres Marisol y Wilfrido por haberme apoyado en todo momento, por sus valores, por sus consejos, por confiar en mí, por siempre motivarme a seguir adelante. A mi hermano Lenin por darme su compañía y apoyo durante todo este tiempo. Se la dedico de todo corazón, gracias a ustedes lo estoy logrando. Los amo.

Erika Belen Pilamunga Llagua

Agradecimiento

Con profunda estima y reconocimiento, extendiendo mi más sincera gratitud a mi director de tesis el Dr. Edgar Lenin Aguirre Riofrío Ph.D. su dedicación docente y su inestimable guía ha sido pilar fundamental en la dirección y enriquecimiento de esta investigación.

Mi gratitud se extiende a la Universidad Nacional de Loja, bastión de excelencia académica, que ha fomentado el desarrollo académico durante todo este tiempo.

A mis docentes de maestría, les agradezco por compartir sus conocimientos y enseñanza en cada uno de los módulos.

A mis compañeros, les agradezco por compartir cada una de sus experiencias profesionales y anécdotas.

A cada uno de ustedes, mi más profundo agradecimiento por su invaluable contribución a este viaje académico.

Erika Belen Pilamunga Llagua

Índice de contenidos

Portada.....	i
Certificación de Tesis.....	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	ix
Índice de anexos	x
1 Título.....	1
2. Resumen	2
Abstract.....	3
3. Introducción	4
4. Marco Teórico.....	6
4.1. Crio conservación de semen ovino.....	6
4.2. Diluyente para la crio conservación en semen ovino	6
4.3. Efectos de la crio conservación en espermatozoides ovinos	6
4.4. Estrés oxidativo	8
4.4.1. Estrés oxidativo en los espermatozoides	9
4.4.2. Estrés oxidativo en procesos de crio conservación	9
4.5. Antioxidantes.....	10
4.7. Procesos metabólicos de los espermatozoides.....	11
4.8. Efecto de los radicales libres sobre la motilidad espermática	12
5. Metodología.....	14
5.1. Área de estudio	14
5.2. Procedimiento.....	14
5.2.1. Enfoque metodológico	14
5.2.2. Diseño de la investigación.....	14
5.2.3. Tamaño de la muestra y tipo de muestreo	15
5.2.4. Técnicas.....	15

5.2.4.1. Campo.....	15
5.2.4.2. Laboratorio.....	16
5.2.5. Variables de estudio	19
5.3. Procesamiento y análisis de la información	19
5.4. Consideraciones éticas.....	19
6. Resultados.....	21
6.1. Evaluación macro y microscópica del semen ovino de la raza Katahdin pre congelación.....	21
6.1.1. Valoración Macroscópica.....	21
6.1.1.1. Volumen.....	21
6.1.1.2. Color.....	21
6.1.1.3. pH.....	21
6.1.2. Valoración Microscópica	21
6.1.2.1. Motilidad Masal.....	21
6.1.2.2. Motilidad individual (%)......	21
6.1.2.3. Viabilidad espermática (%)......	22
6.2. Evaluación de las características espermáticas de semen ovino de la raza Katahdin post descongelación con aplicación de Cafeína.	22
6.2.1. Motilidad Individual (%)......	22
6.2.2. Vitalidad Espermática (%)	22
7. Discusión.....	24
7.1. Volumen de eyaculado	24
7.2. Color	24
7.3. pH	25
7.4. Motilidad masal	25
7.5. Motilidad individual	26
7.6. Viabilidad espermática	26
8. Conclusiones.....	28
9. Recomendaciones.....	29
10. Bibliografía.....	30
11. Anexos.....	37

Índice de tablas

Tabla 1. Esquema del experimento	15
Tabla 2. Valoración espermática de semen fresco de la raza Katahdin pre congelación.	21
Tabla 3. Valoración espermática de semen fresco de la raza Katahdin pre congelación.	22
Tabla 4. Valoración de la motilidad individual del semen ovino de la raza Katahdin post congelación aplicando tres niveles de Cafeína.	22
Tabla 5. Valoración de la vitalidad espermática del semen ovino de la raza Katahdin post congelación aplicando tres niveles de Cafeína.	23

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación de la parroquia Fátima	14
---	----

Índice de anexos

Anexo 1. Colecta de semen ovino Katahdin.....	37
Anexo 2. Evaluación macroscópica de semen fresco.	37
Anexo 3. Evaluación microscópica pre – congelación.	37
Anexo 4. Preparación del diluyente.....	38
Anexo 5. Adición de la cafeína anhídrida.	38
Anexo 6. Envasado y sellado.....	39
Anexo 7. Fase de refrigeración.....	39
Anexo 8. Fase de congelación	39
Anexo 9. Evaluación microscópica post congelación.	40
Anexo 10. Valoración macroscópica de semen fresco	41
Anexo 11. Valoración microscópica de semen pre – congelado	41
Anexo 12. Valoración microscópica post - congelación	42
Anexo 13. Pruebas Estadísticas	46

1 Título

Efecto de la aplicación de diferentes niveles de cafeína sobre las características espermáticas en el semen crioconservado de carneros de pelo.

2. Resumen

La industria ovina ecuatoriana está prosperando gracias a los avances en la biotecnología cuyas técnicas de crioconservación de semen ayudan a mantenerlo viable por un lapso de tiempo prolongado y mejorar la calidad del ganado ovino. En la presente investigación el objetivo fue evaluar el efecto que presenta la aplicación de diferentes niveles de cafeína al medio de crioconservación sobre las características espermáticas pos descongelación en el semen de carneros de pelo, los resultados obtenidos en los tratamientos aplicados fueron analizados mediante un diseño multivariante utilizando la prueba Manova en el programa SPSS versión 26. Se analizó el semen de dos carneros de pelo de raza Katahdin, se aplicó un diluyente de conservación (Triladyl®) y se adicionó un antioxidante en 3 diferentes niveles de cafeína anhidra en tres tratamientos (T1= 1mg cafeína, T2= 2mg cafeína, T3= 3mg cafeína) frente al tratamiento control (T0). Se evaluaron 12 repeticiones (pajuelas) por tratamiento mediante tres colectas, una colecta por cada animal a la semana. Al finalizar el experimento se evidenció que no se presentaron diferencias significativas en las características macro y microscópicas en el semen de los carneros evaluados antes de aplicar los niveles de cafeína al diluyente de conservación (Triladyl®) sin embargo, cuando se realizó la aplicación de los distintos niveles de cafeína a los medios de crioconservación se presentaron diferencias significativas sobre las características microscópicas del semen después de la crioconservación donde el tratamiento 2 demostró el mejor desempeño tanto para la motilidad individual como en la vitalidad espermática post descongelación. Por último, se determinó una correlación negativa entre las variables: motilidad individual y vitalidad espermática vs los tratamientos, pues mientras mayor fue la dosis de cafeína existió una menor motilidad individual y vitalidad espermática.

Palabras claves: Triladyl®, cafeína anhidra, ovino, semen, vitalidad espermática.

Abstract

The Ecuadorian sheep industry is thriving thanks to advances in biotechnology, particularly cryopreservation techniques that help maintain semen viability over extended periods and improve the quality of sheep livestock. The objective of the present study was to evaluate the effect of applying different levels of caffeine to the cryopreservation medium on post-thaw sperm characteristics in hair sheep ram semen. The results of the applied treatments were analyzed using a multivariate design with the MANOVA test in SPSS version 26. Semen from two Katahdin hair sheep rams was analyzed. A preservation extender (Triladyl®) was used, and an antioxidant—anhydrous caffeine—was added at three different concentrations across three treatments (T1 = 1 mg caffeine, T2 = 2 mg caffeine, T3 = 3 mg caffeine) compared to a control treatment (T0). Twelve straws per treatment were evaluated through three semen collections, one per animal each week. At the end of the experiment, no significant differences were observed in the macro- and microscopic characteristics of the semen before applying the caffeine levels to the preservation extender (Triladyl®). However, significant differences were found in the microscopic characteristics of the semen after cryopreservation when different levels of caffeine were added to the media. Treatment 2 showed the best performance in both individual motility and post-thaw sperm viability. Finally, a negative correlation was determined between the variables: individual motility and sperm viability versus the treatments, as higher doses of caffeine resulted in lower individual motility and sperm viability.

Key words: Triladyl®, anhydrous caffeine, sheep, semen, sperm vitality

3. Introducción

En Ecuador, la industria ovina está prosperando económicamente, en gran parte gracias a la biotecnología, donde la crioconservación de semen permite mantenerlo viable y fecundante por un tiempo prolongado para mejorar la calidad del ganado donde el macho reproductor desempeña un rol fundamental tanto en la monta natural como en los programas de reproducción artificial, por dicha razón el éxito o fracaso del proceso reproductivo depende directamente de la salud sexual, la disposición para realizar la monta y la calidad de la esperma del carnero.

En el proceso de crioconservación, los espermatozoides experimentan cambios negativos provocados por factores perjudiciales que afectan a la fertilidad, pues dicho proceso incluye el desarrollo de diferentes protocolos como: la dilución, congelación y descongelación del semen ovino (Escudero, 2015). Debido a los sucesos descritos, Sánchez (2024) resalta la importancia de contar con principios activos que al combinarse puedan actuar como agentes protectores de espermatozoides durante la etapa de crioconservación, por lo cual dichas sustancias jugarían un papel crucial en la preservación de la calidad seminal del carnero, asegurando así un porcentaje alto de células reproductivas viables.

En la actualidad existen diversas investigaciones dedicadas a analizar el efecto de la cafeína en el semen ovino, los cuales muestran resultados diversos. Nieto et al. (2021) mencionan que al añadir un 5% de pulpa de café en la alimentación de los carneros se evidenció un impacto significativo en las propiedades del semen fresco o congelado. Así mismo, el estudio de Wilde, de la Vega y Cruz (2004) asegura que al añadir dosis establecidas de cafeína de manera directa a los diluyentes de semen mostró resultados positivos, pues se evidenció la mejoría en las características físicas de los espermatozoides, así como las actividades enzimáticas y la dinámica después de la descongelación. Estos estudios sugieren que cuando se utiliza la cafeína en concentraciones adecuadas se puede obtener efectos favorables en la calidad espermática de distintas especies, entre ellas los carneros de pelo (Sánchez, 2024)

Por los motivos mencionados anteriormente, el objetivo general del presente estudio fue: Evaluar el efecto de la cafeína añadida en distintos niveles al medio de crioconservación y su efecto sobre las características espermáticas en el semen de carneros de pelo; además los objetivos específicos fueron: Evaluar las características espermáticas del semen pre-

congelado antes de la aplicación de los diferentes niveles de cafeína al diluyente de conservación (Triladyl ®); Evaluar las características espermáticas del semen post congelación en los diferentes niveles de cafeína aplicado. Todos los objetivos planteados permitieron evidenciar si la aplicación de niveles de cafeína al medio de crio conservación influye sobre las características espermáticas de: motilidad y vitalidad espermática presente en el semen crio conservado de carneros de pelo.

4. Marco Teórico

4.1. Crio conservación de semen ovino

En el Ecuador se ha llevado a cabo diversos estudios sobre la crio conservación de semen para optimizar el proceso. Estos estudios han evaluado distintas combinaciones de extensores y crioprotectores, encontrando que la utilización de glicerol junto con sacarosa o trehalosa ofrece resultados superiores en términos de viabilidad post-descongelación en comparación con el etilenglicol. Este hallazgo sugiere que estas alternativas pueden ser más efectivas para la criopreservación del semen ovino (Sandoval et al., 2012).

Las investigaciones enfocadas en alternativas a la yema de huevo fresca en los extensores de semen han mostrado que tanto la yema de huevo clarificada como la lecitina de soya pueden ser opciones efectivas. Además, la inclusión de hidroxitolueno butilado (BHT) ha demostrado, en general, mejorar la calidad espermática (Izquierdo et al., 2009).

De igual forma, otros estudios han comparado diversas razas de ovejas tropicales y distintos tipos de extensores, encontrando diferencias significativas en la motilidad espermática post-descongelación (Chunata et al., 2022). Estos avances son fundamentales para optimizar los protocolos de crioconservación de semen ovino, lo que podría tener un impacto positivo en los programas de mejora genética.

4.2. Diluyente para la crio conservación en semen ovino

Estudios recientes han investigado varios diluyentes y aditivos para mejorar la criopreservación del semen de carnero. Los diluyentes basados en Triladyl han mostrado resultados más favorables en el mantenimiento de la motilidad, viabilidad e integridad acrosómica de los espermatozoides tanto en la refrigeración como el proceso de la post-descongelación (Quito et al., 2025; Sandoval et al., 2012).

También se ha estudiado la suplementación con antioxidantes, con Tempo a una concentración de 0,5 mM en diluyentes a base de Tris mejora la calidad espermática tras la descongelación (Ruiz et al., 2012). De igual forma, la adición de 50 µM de trolox/108 espermatozoides o 50 µg de catalasa/mL de eyaculado a diluyentes basados en Triladyl contribuye significativamente a mejorar la motilidad total y progresiva, así como la viabilidad espermática, tanto en la fase previa a la congelación como después de la descongelación (Torres et al., 2019).

4.3. Efectos de la crio conservación en espermatozoides ovinos

La crio conservación del semen ovino afecta negativamente la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides, reduciendo significativamente la motilidad progresiva y el

porcentaje de espermatozoides vivos sin reacción acrosomal (Hernández *et al.*, 2012). No obstante, se han propuesto diversas estrategias para contrarrestar estos daños. Una de ellas es la incorporación del antioxidante Tempo a una concentración de 0,5 mM en un diluyente basado en Tris, lo cual ha demostrado mejorar notablemente la calidad del semen congelado, al incrementar la motilidad progresiva y la viabilidad espermática, además de reducir la capacitación prematura de los espermatozoides (Ruiz, 2012).

La adición de glutación reducida (GSH) durante la criopreservación del semen ovino ha evidenciado efectos protectores sobre la integridad del ADN y la funcionalidad mitocondrial de los espermatozoides, sin embargo, no tuvo impacto en la peroxidación lipídica y se reportó un afectó negativo en la integridad acrosomal (Pérez y Nichi, 2013). Estos resultados sugieren que los antioxidantes pueden ser una estrategia prometedora para mejorar la calidad del semen ovino crio conservado.

La reducida capacidad fecundante que presentan los espermatozoides tras la crio preservación se atribuye principalmente a dos factores clave: la baja viabilidad luego del proceso de congelación y los daños subletales sufridos por una parte de los espermatozoides que logran sobrevivir. Estos efectos adversos están relacionados con varios factores estresantes, tales como los cambios bruscos de temperatura, el estrés osmótico, la formación de cristales de hielo intracelular y la toxicidad celular. En particular, las variaciones térmicas pueden inducir alteraciones en la membrana espermática, comprometiendo su funcionalidad (Watson, 2000).

Durante el proceso de crioconservación, las membranas espermáticas sufren daños que, en algunos casos, pueden revertirse parcialmente tras la descongelación. Uno de los principales efectos es la reorganización de la fase lipídica de la membrana, lo que provoca el agrupamiento de las proteínas integrales. Esta alteración puede comprometer la funcionalidad de dichas proteínas, especialmente aquellas involucradas en el transporte de iones, como los canales iónicos. Como consecuencia, la permeabilidad de la membrana plasmática aumenta después del congelamiento. Además, se ve afectada la regulación intracelular del calcio, lo que puede interferir con múltiples funciones celulares. En situaciones extremas, estos daños resultan incompatibles con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994).

En condiciones normales, entre un 8% y un 24% de los espermatozoides presentes en el semen fresco ya presentan membranas plasmáticas debilitadas. Durante los procesos de congelación y posterior descongelación, estas membranas tienden a fragmentarse aún más, lo que conlleva una reducción significativa en la vitalidad espermática y, en consecuencia, en la calidad general del semen (Muhammad *et al.*, 2002).

4.4. Estrés oxidativo

Una comprensión más profunda del concepto de estrés oxidativo requiere imaginar un entorno aeróbico, donde las células y su entorno mantienen un delicado equilibrio entre la generación de radicales libres y los mecanismos encargados de neutralizarlos o reparar los daños que puedan causar. Este equilibrio es esencial para evitar que una producción excesiva de radicales libres afecte negativamente los procesos biológicos celulares, comprometiendo su funcionalidad y eficiencia (Miquel, 1991; Harman, 2003).

Desde esta perspectiva, el estrés oxidativo se manifiesta como un desequilibrio en el balance fisiológico entre la producción de radicales libres y los mecanismos antioxidantes encargados de neutralizarlos. Este desequilibrio puede originarse por una producción excesiva de radicales libres, por una disminución en la capacidad de respuesta de los sistemas compensadores, o por la combinación de ambos factores simultáneamente (Sies y Cadenas, 1985).

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a nivel celular puede superar la capacidad de las defensas antioxidantes, llevándolas a su destrucción. Esta situación genera diversas alteraciones, entre ellas deformidades celulares por la interrupción de procesos naturales como la espermatogénesis, afectaciones en la funcionalidad de los espermatozoides y, como resultado, problemas de infertilidad (Agarwal et al., 2014).

El estrés oxidativo afecta principalmente a las macromoléculas celulares, como los lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, causando daños significativos en la funcionalidad de los espermatozoides. Este daño es principalmente resultado de la peroxidación lipídica inducida por las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que impacta negativamente en parámetros clave como la motilidad, la integridad de la membrana espermática y la fertilidad (Sarıözkan et al., 2009). El aumento considerable del estrés oxidativo también afecta al ADN espermático, la transcripción de ARN y los telómeros, lo que puede derivar en infertilidad, mortalidad embrionaria y, como consecuencia, pérdida de la gestación (Agarwal y Bui, 2017).

Algunas investigaciones sugieren que los sistemas antioxidantes se desarrollaron en un contexto evolutivo, donde los organismos celulares, en su transición hacia un sistema de respiración aeróbica más eficiente energéticamente, necesitaban crear un complejo sistema de defensa para contrarrestar los subproductos altamente reactivos generados. Esto dio lugar a la producción de diversas moléculas e iones que ayudan a mantener un "equilibrio redox" que favorezca el desarrollo sostenible de la vida en nuevos entornos biológicos (Freeman y Grapo, 1982).

Aunque los sistemas antioxidantes son esenciales, el estrés oxidativo suele asociarse a efectos negativos sobre una variedad de moléculas, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. También impacta diversos procesos biológicos, tales como la mutagénesis, los procesos carcinogénicos, los daños a las membranas celulares, la peroxidación lipídica, la oxidación proteica y la fragmentación del ADN. El origen de estos fenómenos radica principalmente en la formación de radicales libres, los cuales se derivan de la respiración celular en presencia de oxígeno o nitrógeno (Sies y Cadenas, 1985; Agarwal et al., 2006).

4.4.1. Estrés oxidativo en los espermatozoides

El estrés oxidativo en los espermatozoides ocurre cuando hay un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antioxidantes, lo que lleva a una disminución de la calidad y la fertilidad del espermatozoide (Christova et al., 2004; López et al., 2011).

La membrana espermática, rica en ácidos grasos insaturados, es especialmente vulnerable a los ataques de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca peroxidación lipídica y daños en las estructuras esenciales del espermatozoide (Christova et al., 2004). Debido a esta vulnerabilidad, los niveles elevados de ROS en el semen se asocian estrechamente con la infertilidad masculina, afectando aspectos clave como la motilidad espermática, la integridad de la membrana y el ADN, tal como se señala en el estudio de Zayas et al. (2000).

El estrés oxidativo también puede ocurrir durante el manejo y la manipulación del semen, lo que compromete la viabilidad de los espermatozoides y su capacidad de fertilización (Izquierdo et al., 2009). En este contexto, los sistemas antioxidantes juegan un papel crucial en la protección de los espermatozoides contra el daño oxidativo. Por esta razón, la evaluación de los marcadores de estrés oxidativo y las defensas antioxidantes es fundamental para obtener información sobre la calidad de la espermatogénesis, lo que podría guiar terapias antioxidantes en pacientes con problemas de fertilidad (Zayas, 2000).

4.4.2. Estrés oxidativo en procesos de crio conservación

La historia ha demostrado la notable capacidad de los espermatozoides para sobrevivir a temperaturas cercanas a la congelación, como lo evidenció Spallanzani en 1776, quien logró congelar semen en nieve y reactivarlo treinta minutos después en un medio templado. A pesar de esta capacidad para almacenarse a temperaturas cercanas a los -196°C , los espermatozoides sufren daños estructurales y fisiológicos durante el proceso de crioconservación (Watson, 2000).

La congelación y descongelación de las dosis seminales ocasiona una serie de daños que afectan directamente la supervivencia celular de los espermatozoides. Durante este

proceso, se elimina el potencial antioxidante natural de la muestra, generando un ambiente nocivo para los espermatozoides. Esto ocurre debido a la eliminación de gran parte del plasma seminal, que es reemplazado por el medio crioprotector (Gadea et al., 2005).

La estructura y composición de la membrana plasmática juegan un papel crucial en el proceso de crioconservación. La forma en que esta membrana responda durante la congelación y descongelación determinará, en gran medida, la supervivencia, funcionalidad y potencial fértil de las muestras seminales crioconservadas (Waterhouse et al., 2006).

Asimismo, los radicales libres generados durante la crioconservación han sido objeto de diversos estudios. Se ha observado que la producción de radicales libres en los espermatozoides aumenta en respuesta al descenso de temperatura durante la crioconservación, especialmente en temperaturas cercanas a los 4°C (Wang et al., 1997)

4.5. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de retardar, prevenir y detener la oxidación de los sustratos o moléculas). Pueden variar desde moléculas complejas, como el superóxido dismutasa, la catalasa, las peroxirredoxinas, hasta moléculas más simples como el ácido úrico y el glutatión (Gutteridge y Halliwell, 2000; Arancibia et al., 2022)

La adición de antioxidantes a los extensores de semen ha demostrado efectos beneficiosos en la preservación de las características seminales y en la mejora de la fertilidad tras la conservación (Michael et al., 2008).

Un ejemplo específico es el antioxidante Tempo que mejoró significativamente la calidad del semen después de la descongelación, aumentó la motilidad progresiva, la viabilidad y la integridad acrosómica, y redujo la capacitación prematura de los espermatozoides en comparación con los grupos de control (Ruiz et al., 2012; Ruiz et al., 2007).

No obstante, el uso excesivo de antioxidantes puede resultar perjudicial, ya que estas sustancias desempeñan un papel crucial en las etapas de adquisición del potencial fertilizante de los espermatozoides (Savi et al., 2015). Por lo tanto, es fundamental tener en cuenta el tipo y la concentración de antioxidantes al desarrollar protocolos para la crioconservación del semen ovino.

4.6. Cafeína

La cafeína constituye como un compuesto alcaloide, que forma parte de la familia de las metilxantinas, que son derivadas de los inhibidores de fosfodiesterasas (Stephens *et al.*, 2013).

El grupo de compuestos que incluye la cafeína, la teofilina (presente en el té) y la teobromina (en el chocolate), entre otros, tiene efectos estimulantes sobre el sistema nervioso autónomo. En particular, la cafeína tiene un efecto directo en el metabolismo celular, incluidas las células espermáticas. Se cree que este efecto está relacionado con la concentración de iones de calcio (Barakat et al., 2015). La cafeína aumenta la glucólisis en los espermatozoides, lo que a su vez mejora su motilidad debido al aumento en la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Este incremento en los niveles intracelulares de ATP promueve una mayor motilidad espermática (Stephens et al., 2013).

Estudios recientes han evaluado el uso de antioxidantes en la crioconservación de semen de carnero y búfalo. La adición de cafeína en el extensor de semen de carnero, a concentraciones bajas (0,1 mM) o medias (0,2 mM), ha demostrado mejorar las características físicas de los espermatozoides, las actividades enzimáticas y la dinámica después de la descongelación (Hamid, 2018).

4.7. Procesos metabólicos de los espermatozoides

Towns, K. M y Luke, R. K. J. (1976) indican que los espermatozoides obtienen la energía necesaria para su motilidad de las reservas intracelulares de ATP, cuya utilización está regulada por la concentración endógena de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Este compuesto también influye directamente en la motilidad de los espermatozoides. Los espermatozoides degradan azúcares como la glucosa, la fructosa y el ácido láctico en un proceso fructolítico que ocurre en condiciones anaeróbicas, ya que la fructosa, principal azúcar del semen, es esencial para que los gametos sobrevivan en este ambiente.

Los espermatozoides degradan azúcares como la glucosa, la fructosa y el ácido láctico en un proceso fructolítico que ocurre en condiciones anaeróbicas, ya que la fructosa, principal azúcar del semen, es esencial para que los gametos sobrevivan en este ambiente. Este aspecto es particularmente relevante en la crioconservación del semen y la inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

El metabolismo espermático incluye la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, procesos interconectados que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproductos (Peña et al., 2021). En el caso de las especies ovinas, los espermatozoides pueden metabolizar varios ácidos grasos, como el ácido mirístico (presente en los diglicéridos) y el ácido docosahexaenoico (abundante en los fosfolípidos) (Neill y Masters, 1972). La glucosa es una fuente crucial de energía para los espermatozoides, pero las

concentraciones óptimas son inferiores a las que se encuentran en los diluyentes comerciales (Díaz y Arvelo, 2005).

Mantener la homeostasis redox es esencial para el correcto funcionamiento de los espermatozoides. Las técnicas de separación de espermatozoides, como el swim-up, Percoll, filtración con fibra de vidrio y Sephadex, pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides y su estado acrosómico tras la descongelación. La filtración con fibra de vidrio ha mostrado resultados prometedores en la mejora de la motilidad progresiva y la viabilidad de los espermatozoides ovinos después de la descongelación (Vázquez et al., 2012).

En los procesos metabólicos, la generación de energía a través de la vía oxidativa, que ocurre en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis. Gran parte del ATP producido se utiliza como fuente de energía para la motilidad de los espermatozoides, así como para diversos procesos de transporte activo en las membranas espermáticas. Estos procesos de transporte son esenciales para mantener concentraciones adecuadas de iones vitales para el funcionamiento celular de los espermatozoides (Sánchez, 2024).

4.8. Efecto de los radicales libres sobre la motilidad espermática

Las células espermáticas son particularmente vulnerables al daño causado por los radicales libres debido a las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana espermática (Tortolero et al., 2005). Este tipo de membrana es más propenso a sufrir peroxidación lipídica, lo que compromete la integridad celular y, por ende, su función.

Los radicales libres de oxígeno afectan la motilidad espermática a través de una serie de eventos bioquímicos. Uno de los principales mecanismos es la disminución de la fosforilación de proteínas que recubren el axonema, la estructura responsable del movimiento del espermatozoide. La fosforilación de proteínas es crucial para mantener la motilidad, y su alteración puede resultar en la inmovilización de los espermatozoides, debido a una reducción en la fluidez de la membrana (Sánchez, 2024).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) involucradas en este proceso. Este compuesto puede atravesar la membrana espermática e inhibir la actividad de ciertas enzimas esenciales, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que regula la velocidad de la glucosa en la vía de la hexosa monofosfato. Esta inhibición reduce la disponibilidad de NADPH, un cofactor clave para la producción de radicales libres y el mantenimiento de la homeostasis redox en el espermatozoide (Aitken et al., 1998).

Además, la disminución de NADPH afecta la capacidad de los espermatozoides para generar energía y controlar los radicales libres, lo que incrementa la peroxidación lipídica en su membrana. La peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática altera los ácidos grasos insaturados, lo que deteriora aún más la funcionalidad y la viabilidad de los espermatozoides (García et al., 2011). Este proceso de peroxidación lipídica es una de las principales causas del daño espermático asociado con el estrés oxidativo, lo que puede llevar a una disminución en la calidad del semen y problemas de fertilidad.

5. Metodología

5.1. Área de estudio

El estudio de evaluación de las características espermáticas aplicando los diferentes niveles de cafeína como un antioxidante en el semen de carneros de pelo, se realizó en la comunidad La Libertad perteneciente a la parroquia Fátima, cantón Pastaza, Provincia de Pastaza.

El clima es húmedo tropical, con una humedad relativa máxima de 90%, con una precipitación superior a 3000mm, la temperatura oscila entre los 18° a 25° y se encuentra ubicada a 01°25'08" de latitud sur y 77°56'37" longitud oeste, a una altitud entre 983 msnm a 1199 msnm (GADPRF, 2023). Donde los productores pecuarios actualmente se han dedicado a la producción ovina por lo que se realizó este estudio para mejorar la productividad; el tiempo requerido que se aplicó en el trabajo de campo fue de 30 días.

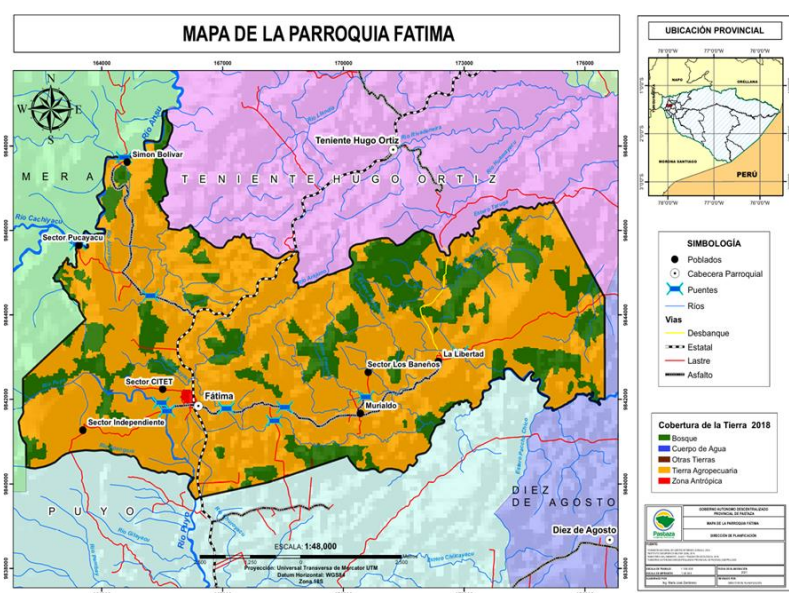


Figura 1. Ubicación de la parroquia Fátima

5.2. Procedimiento

5.2.1. Enfoque metodológico

El estudio fue de análisis cualitativo ya que se evaluó las variables que se enfocó en la interpretación mediante la observación, asimismo fue de análisis cuantitativo ya que las variables consideradas se evaluaron objetivamente y el resultado del producto obtenido se analizó estadísticamente.

5.2.2. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación aplicado fue experimental con un diseño multivariante y un análisis estadístico empleando un Manova, utilizando para ello el programa SPSS versión 26, donde se utilizó 2 carneros de pelo de raza Katahdin con pesos homogéneos, con una alimentación a base de pasto Gramalote (*Axonopus escoparium*) y concentrado, el cual se extrajo el semen y se aplicó un diluyente de conservación (Triladyl®) y adicional un antioxidante en 3 diferentes niveles de cafeína anhidra en cuatro tratamientos (T0= control, T1= 1mg cafeína, T2= 2mg cafeína, T3= 3mg cafeína) se evaluaron 12 repeticiones (pajuelas) por tratamiento; cabe mencionar que se realizó tres colectas de semen, 1 colecta por cada animal a la semana (Tabla 1).

Tabla 1. Esquema del experimento

Raza	Diluyente + Cafeína anhidra	UE (N. de pajuelas evaluadas)
Katahdin M1	T0: Diluyente + 0mg	12
	T1: Diluyente + 1mg	12
	T2: Diluyente + 2mg	12
	T3: Diluyente + 3mg	12
Katahdin M2	T0: Diluyente + 0mg	12
	T1: Diluyente + 1mg	12
	T2: Diluyente + 2mg	12
	T3: Diluyente + 3mg	12
Total UE		96

5.2.3. *Tamaño de la muestra y tipo de muestreo*

El estudio se realizó en las instalaciones de laboratorio donde se utilizó el eyaculado de 2 ovinos de pelo, considerando los siguientes criterios: coloración blanca y cremosa, olor característico sui géneris (leche fresca) y sin presencia de partículas extrañas. Dónde una pajuela fue considerada una unidad experimental (UE), total fueron 48 UE (pajuelas) por animal, obteniendo 96 pajuelas totales en las cuales se aplicaron en cuatro tratamientos (T0 control, T1= 1mg cafeína, T2= 2mg cafeína, T3= 3mg cafeína) con 12 repeticiones (UE) por cada tratamiento, considerando las tres colectas de eyaculado obtenido por cada ovino.

5.2.4. *Técnicas*

5.2.4.1. **Campo.**

- Armado de la vagina artificial

Antes de armar la vagina artificial se lavó todas las partes y se secó con papel toalla. Se procedió a colocar la camisa de látex dentro del tubo plástico cilíndrico doblando así los extremos del mismo, además se incorporó el cono de silicona que permitió que el semen pase de la vagina artificial al tubo Falcon (15 mL). Se retiró la tapa de la válvula y se llenó de agua a una temperatura de 50°C, una vez llena se cerró la tapa de la válvula y se ajustó la presión de la vagina artificial realizando insuflación de aire (Sanchez, 2024).

- Extracción de semen

Se incorporó a los machos al corral con las hembras, también se utilizó el soporte de sujeción para inmovilizar a la oveja, estas técnicas permitieron que se realice la monta, para posteriormente extraer el semen con ayuda de la vagina artificial, en la misma se aplicó lubricante no espermicida para mejor penetración.

La monta y colección de semen se realizó una vez por semana durante 3 semanas teniendo 3 colectas por cada animal. Para cada ovino, la primera sesión de monta diaria se realizó entre las 8:00 de la mañana y para el segundo animal, 10 de la mañana.

Los eyaculados se recolectaron en tubos Falcón (15 mL), protegidos con papel aluminio para evitar el contacto con los rayos solares (Anexo 1).

5.2.4.2. Laboratorio.

- Evaluación macroscópica de semen fresco

Volumen: Se utilizó un tubo Falcon graduado de 15 mL, el cual se determinó el valor del eyaculado a través de la lectura directa expresada en mL(anexo 2).

Color: Se evaluó a través de la visualización directa del eyaculado obtenido, tomando en cuenta los siguientes aspectos: blanco cremoso, blanco lechoso, transparente y translucido (Aisen, 2024).

pH: El papel tornasol se sumergió en el eyaculado así de esta manera se evaluó el pH considerando aceptable de 6.2 a 7.3 (Rojas, 2024).

- Evaluación microscópica pre – congelación

Motilidad Masal (%): Para evaluar la motilidad masal se colocó 5 µl de semen fresco en un portaobjetos que estaba a una temperatura de 37° C, con la ayuda del microscopio con un lente de 10X se observó un movimiento en masa de los espermatozoides en forma de ondas oscuras bien marcadas y con movimiento rápido; tomando en cuenta para la evaluación la escala de calificación del 1 a 5, donde 1 carece de movimiento y 5 es la máxima calificación con mayor movimiento en masa (Anexo 3).

Motilidad Individual (%): Una vez realizado la dilución del semen ovino con la ayuda de la micro pipeta se tomó de muestra 5 µl y se colocó en el portaobjetos a una temperatura de 37° C y se cubrió con un cubreobjetos, con un lente a 40X se observó el movimiento rectilíneo progresivo el cual se tomó en cuenta para la valoración del porcentaje de motilidad individual (Anexo 3).

Viabilidad espermática (%): Para la viabilidad espermática se aplicó eosina – nigrosina misma que tiñó a los espermatozoides vivos de color rosa pálido o blanca y de color rosa oscuro a los espermatozoides muertos.

Preparación del diluyente y adición de la cafeína: Para la preparación del diluyente se mezcló 4 mL de (Triladyl ®), 12 mL de agua bidestilada “Lavetec” y 4 mL de yema de huevo, para ello pasamos la yema por el papel toalla para absorber todo el restante de la clara de huevo, con la ayuda de una jeringa de 5 mL y una aguja de calibre 18G *1 ½” se extrajo la yema (Anexo 4).

Esta preparación se utilizó en una pre – dilución del semen, una vez extraído el semen se realizó la pre dilución en una relación 1:1 (vol:vol), es decir, el mismo volumen del eyaculado se incorporó el diluyente previamente preparado que nos ayudó para mantener los espermatozoides estables para los siguientes procesos (Mullo, 2023).

Una vez que se obtuvo completamente diluido el semen de ovino se dividió en cuatro fracciones iguales señaladas como T0, T1, T2 y T3 en diferentes tubos Falcon (15 mL), el cual se añadió para cada tratamiento los diferentes niveles de cafeína por animal (Anexo 5).

- Cálculo de número de dosis de semen

El cálculo se realizó en base a los lineamientos de las siguientes formulas (Sanchez, 2024).

$$\text{Concentración espermática} = \text{Total de espermatozoides} * 5 * 10000 * 200$$

$$\text{Esperm. viables} = \text{vol. eyaculado} * \text{concent. esperm.} * \text{motilidad ind.} * \text{viabilidad}$$

$$\# \text{ Pajillas} = \frac{\text{Espermatozoides viables}}{\text{Concentración deseada}}$$

$$\text{Volumen final (eyaculado + diluyente)} = \frac{\# \text{ Pajillas}}{4}$$

- Envasado y sellado de pajillas

Una vez diluido el semen e incorporado la cafeína se realizó el envasado en pajillas de 0.25 ml anteriormente marcadas para identificar los diferentes tratamientos, con la ayuda de

una jeringa de insulina se fue llenando y con el peine bubbler se dejó una burbuja de aire para evitar que se reviente al momento de la descongelación y se selló con polvo polivinilo (anexo 6).

- Proceso de crioconservación

Las pajuelas obtenidas por cada tratamiento se pasaron por las siguientes fases.

- Fase de refrigeración

Las curvas de temperatura ayudaron para el descenso controlado de la misma, para evitar el choque térmico en los espermatozoides, la cual descendió a una temperatura de 4° C durante 2 horas, a través de la adición de hielo en un cooler con agua para mantener a esa temperatura deseada (Anexo 7).

- Fase de congelación

Para la congelación se utilizó un cooler donde se agregó 2 cm de nitrógeno líquido y se incorporó un rack con capacidad de 80 pajillas a una distancia de 6cm del nivel de nitrógeno líquido. El primer descenso fue de 4° C a -6° C durante 10 minutos. En el segundo descenso se bajó el rack a una distancia de 4 cm del nivel de nitrógeno líquido de -6° C a -196° C durante 10 minutos, todo este procedimiento se tapó el cooler; una vez que se realizó este procedimiento se dejó caer las pajillas al nitrógeno líquido del cooler. Posteriormente se procedió a colocar las pajillas en un goblet, finalmente se crio conservó todas las pajuelas en el tanque de nitrógeno (Anexo 8).

- Evaluación microscópica post – congelación

Una vez congelado las pajuelas se procede a descongelar a baño maría a una temperatura de 37° C por 1 minuto, donde se evaluó lo siguiente:

Motilidad Individual (%): Se colocó una gota de semen diluido mismo que fue puesto sobre un portaobjeto a una temperatura de 37° C y protegido por un cubreobjetos; el análisis se realizó con un microscopio a 40X, donde se observó si más del 50% de los espermatozoides que estaba en el campo posee movimiento o no, donde se tomó en cuenta los espermatozoides con movimiento progresivo lineal y no los que se movían de manera circular. Se calculó la motilidad individual los espermatozoides en movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides observados en el campo de visión, valores que se obtuvieron en una escala de 0 a 100% (Mullo, 2023).

Vitalidad espermática (%): En este proceso se colocó 3µl de muestra de esperma en un portaobjetos y se añadió 10µl de solución eosina – nigrosina, se homogenizó y se dejó que la tinción se fije por unos 30 segundos, finalmente se realizó el frotis y se dejó secar a

temperatura ambiente por unos 3 minutos aproximadamente. Para el análisis se utilizó un microscopio a 100X, donde se colocó el portaobjetos y se contó un mínimo de 100 espermatozoides en diferentes campos del portaobjetos, se tomó en cuenta a los espermatozoides cuya cabeza fueron teñidas de color rosado claro o de color blanco, los mismo que fueron denominados como vivos, por otro lado, los espermatozoides que estaban muertos, la cabeza se tiñó de color rosa oscuro (Anexo 9).

Para calcular el porcentaje de vitalidad espermática se aplicó la siguiente formula (Mullo, 2023).

$$Vitalidad\ espermatica(\%) = \frac{N^{\circ}\ espermatozoides\ muertos}{N^{\circ}\ espermatozoides\ vivos} \times 100$$

5.2.5. Variables de estudio

Evaluación macroscópica pre – congelación (semen fresco).

- Volumen (mL)
- Color (blanco cremoso, blanco lechoso, lechoso, translucido)
- pH (escala de 1-14)

Evaluación microscópica pre – congelación.

- Motilidad Masal (escala 1 – 5)
- Motilidad Individual (%)
- Viabilidad espermática (%)

Evaluación microscópica post – congelación.

- Motilidad Individual (%)
- Vitalidad espermática (%)

5.3. Procesamiento y análisis de la información

En las variables macroscópicas de semen fresco analizadas fueron el volumen de eyaculado y pH donde se aplicó la media.

Para las variables microscópicas pre – congelación (motilidad masal, motilidad individual y viabilidad) se utilizó la media.

En las variables microscópicas post – congelación se empleó diseño multivariante utilizando una prueba Manova en el programa SPSS versión 26 (Anexo 13).

5.4. Consideraciones éticas

Los animales fueron manejados de acuerdo a las normas para el cuidado y uso de animales en investigación según el Código Orgánico del Ambiente (ROS N.º 983, Ecuador).

6. Resultados

6.1. Evaluación macro y microscópica del semen ovino de la raza Katahdin pre congelación.

6.1.1. Valoración Macroscópica

Dentro de las variables obtenidas para la valoración microscópica (Anexo 10) se tomaron en cuenta las siguientes:

6.1.1.1. Volumen.

Para la variable de volumen del eyaculado de semen ovino se obtuvieron valores entre 1.43 a 1.40 mL, dando una media de 1.42 mL (Tabla 2); valores que se encuentra dentro de los rangos promedios de acuerdo con Ramírez *et al.* (2019), quienes manifiestan en su estudio volúmenes entre 0.5 a 2 mL de eyaculado que puede variar de acuerdo a la edad, tamaño, condición corporal propias de los animales.

6.1.1.2. Color.

El color que muestra cada eyaculado de semen presenta una tonalidad blanca para los dos carneros, presentando una diferencia en la consistencia para M1 cremosa y para el M2 lechosa (Tabla 2). Tonalidades que según Castro *et al.* (2017), menciona que todos los eyaculados en carneros obtenidos en su estudio presentan una coloración blanca cremosa como una característica adecuada del semen.

6.1.1.3. pH.

Los valores de pH obtenidos se encuentran en una escala de 7.3 a 7.7 respectivamente, con una media de 7.5. Al respecto Rojas (2024) menciona que, en el carnero y el macho cabrío, los valores de pH están dentro de 6.2 a 7.3 tomando en cuenta un pH de 7.5 como una referencia aceptable.

Tabla 2. Valoración espermática de semen fresco de la raza Katahdin pre congelación.

Carnero	Volumen (ml)	Color	pH
M1	1.43	blanco cremoso	7.3
M2	1.40	blanco lechoso	7.7
Promedio	1.42		7.5

6.1.2. Valoración Microscópica

6.1.2.1. Motilidad Masal.

La motilidad masal se puede observar en la Tabla 3, la cual presenta un valor ligeramente superior en el carnero uno (M1) con una valoración de 5, mientras el carnero 2 (M2) presento un valor de 4.

6.1.2.2. Motilidad individual (%).

La motilidad individual se presenta en la Tabla 3, en la cual existe una diferencia en los porcentajes presentando una mayor motilidad individual el carnero 1 (M1) con el 76.7% mientras el carnero 2 (M2) con el 66.7% (Anexo 11).

6.1.2.3. Viabilidad espermática (%).

La Tabla 3 presenta los valores referentes a la viabilidad espermática de los carneros evaluados en la presente investigación los cuales presentaron un valor superior en la muestra (M1) con el 80%, mientras la muestra (M2) presento un valor de 70% (Anexo 11).

Tabla 3. Valoración espermática de semen fresco de la raza Katahdin pre congelación.

Carnero	Motilidad Masal (escala 1-5)	Motilidad Individual (%)	Viabilidad (%)
M1	5	76.7	80
M2	4	66.7	70
Promedio	4.5	71.7	75

6.2. Evaluación de las características espermáticas de semen ovino de la raza Katahdin post descongelación con aplicación de Cafeína.

6.2.1. Motilidad Individual (%)

La motilidad individual que se presenta en la Tabla 4, la cual muestra diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el T3 (3 mg de cafeína) con el 21.3% y el resto de los tratamientos, sin embargo, la presente investigación reporta que el tratamiento con mejor desempeño manifestó el T2 (2 mg de cafeína) con el 51.3%.

Tabla 4. Valoración de la motilidad individual del semen ovino de la raza Katahdin post descongelación aplicando tres niveles de Cafeína.

Carnero	T0 (%)	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)
M1	49.2	48.3	63.3	24.2
M2	37.5	30	39.2	18.3
Promedio	43.4 ^a	39.2 ^a	51.3 ^a	21.3 ^b

6.2.2. Vitalidad Espermática (%)

Al analizar la Tabla 5 podemos visualizar los resultados obtenidos con respecto a la vitalidad espermática en la cual presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el T3 (3 mg de cafeína) con el 29.1%, y el resto de los tratamientos en los cuales el T2 (2mg de cafeína) presento un mejor desempeño, con el 70.5% (Anexo 12).

Tabla 5. Valoración de la vitalidad espermática del semen ovino de la raza Katahdin post descongelación aplicando tres niveles de Cafeína.

Carnero	T0 (%)	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)
M1	62.9	57.6	81.2	33.5
M2	43.3	45.6	59.8	24.7
Promedio	53.1 ^a	51.6 ^a	70.5 ^a	29.1 ^b

7. Discusión

7.1. Volumen de eyaculado

Ramírez *et al.* (2019), manifiestan en su estudio volúmenes entre 0.5 a 2 ml de eyaculado; por otro lado Escudero (2015), reporta en su investigación un promedio de volumen de eyaculado de 0.96 ml, mientras Valdez (2013) indica que, dentro de un estudio se emplearon distintos métodos de recolección seminal donde se identificó que la vagina artificial es un método apto obtener semen de manera segura en el carneros Katahdin cuya cantidad normal de eyaculado por carnero es la siguiente: en carneros jóvenes de 0,5 a 0,7ml y en adultos el parámetro normal va de 0,5 a 2 ml. Por otro lado, en la investigación realizada por López, (2016) se evaluaron diferentes aspectos relevantes en machos Pelibuey entre los cuales se consideró: la raza, la edad y la época de la capacidad reproductiva de machos de 34 meses de edad, de quienes se pudo obtener un volumen de eyaculado de 0,78 ml bajo condiciones de clima tropical.

Guerrero *et al.* (2009) en su estudio al evaluar el uso de dilutores hipertónicos en ovinos de raza Black Belly considerando la edad de dos a tres años y medio de edad mismo que fue realizado en el Valle de Lima pudo obtener un volumen de eyaculado de 1.1 ml, mientras (Hafez. *et al.*, 2004 y Evans *et al.* ,1990) evalúan dos diferentes métodos de recolección que la importancia del volumen de eyaculado depende de diferentes aspectos importantes como: la metodología empleada para la recolección del eyaculado, edad del ovino y su estado de salud, cabe recalcar la importancia del desempeño del personal encargado de la recolección del semen y el intervalo entre muestras recolectadas, es decir la frecuencia de obtención de muestras o número de servicios por semana, factor que se debe considerar en toda investigación. Dichos factores demostraron que el volumen obtenido en el presente estudio se encuentra dentro de los parámetros normales.

7.2. Color

En el estudio de Chunata (2019) se indica que en la valoración de contenido seminal en ovinos Katahdin y Pelibuey en la Amazonía Ecuatoriana, menciona que la coloración en carneros de raza Pelibuey fue una tonalidad blanco lechoso, mientras que en carneros Black Belly la coloración fue blanco cremoso, por otro lado Castro *et al.* (2017) mencionan en su investigación que la coloración de eyaculado obtenida fue blanca cremosa; por otro lado Escudero (2015) reporta que en su investigación qué, la coloración de eyaculado en carneros criollos fue una coloración blanca cremosa, mientras Rodríguez *et al.* (2007), mencionan que bajo las condiciones de campo, la evaluación del color del semen de carnero se lleva a cabo mediante la observación de la opacidad en el tubo recolector, en la cual se califica como

buena cuando la muestra presenta una coloración cremosa y una condición espesa sin embargo, cuando presenta una tonalidad grisácea y una condición diluida, se considera una muestra de mala calidad; además autores como Hafez *et al.* (2004) y Evans, *et al.* (1990), señalan que la tonalidad del semen ovino presenta tonos lechosos o en algunos casos crema pálido, sin embargo, cuando la coloración suele ser de una tonalidad rosácea, la muestra presenta presencia de sangre, por otro lado al existir la presencia de infección en el tracto reproductivo, la muestra presentará una coloración gris.

Cueto *et al.* (2016) en su manual de procesamiento de semen menciona que el color del semen ovino debe presentar una tonalidad blanco lechoso o cremoso pálido, sin embargo, puede existir una coloración blanquecina amarillenta, de esta manera se tiene una relación directa entre la intensidad del color y el volumen de espermatozoides que se presentan en la muestra; finalmente en algunos casos puede existir la presencia de orina en la muestra de eyaculado, siendo este el caso, la muestra será de color amarillenta, es importante recalcar que la coloración del eyaculado depende de la concentración espermática, y que esta también depende del manejo, alimentación y el número de servicios de los carneros.

7.3. pH

Pillajo (2015), menciona en su estudio evaluando tres diluyentes comerciales en ovino de raza Poll Dorset y Corridale en el cual obtuvo un pH de 6.8 como un valor alto, mientras Chunata (2019) expresa en su investigación acerca de la valoración de contenido seminal en ovinos Katahdin y Pelibuey en la Amazonía Ecuatoriana, promedios de 7, siendo este un pH neutro. Por otro lado, Tapia (2018), menciona en la valoración de calidad seminal de ovinos de raza Corriedale y Mestizos valores de pH de 7, siendo un pH neutro en todas las muestras seminales. Escudero (2015), reporta en su investigación que el valor de pH obtenido fue de 6.7, sin embargo, Hintz. *et al.* (1987), mencionan en su investigación realizada en ovinos de raza Black Belly que la valoración del pH del eyaculado de carnero se encuentra en el rango de 5.9 -7.3. Por otro lado, Illera (1994) manifiesta que, la presencia de orina como fuente de contaminación del eyaculado altera el pH hasta en 7.6, sin embargo, el semen recolectado en el presente estudio se halla dentro de los rangos normales.

7.4. Motilidad masal

Chunata (2019), reporta en su investigación realizada en ovinos tropicales, un mayor valor en la raza Black Belly con 4.75 puntos a diferencia de la raza Pelibuey con una puntuación de 4.5, si bien no existe diferencias significativas con la finalidad de marcar la variable entre las razas; por otro lado, Cueto *et al.* (2016) menciona que la velocidad con que presentan movimiento los espermatozoides marca la motilidad masal, es una escala de

calificación bastante subjetiva, dando valoración de 0-5 puntos; por otro lado, López *et al.* (2016), reporta en su investigación realizada en ovinos Pelibuey considerando aspectos fundamentales como la raza, edad y época del año, un valor de 4.31 en las muestras seminales frescas; sin embargo Viteri (2015), reporta en su investigación considerando la aplicación de Biotecnológicas en ovinos de raza Rambouillet y Poll Dorset una valoración de 5 puntos en semen fresco.

7.5. Motilidad individual

Con respecto a este parámetro, Carrascal *et al.* (2018) menciona en su estudio realizado en ovinos evaluados bajo condiciones ambientales en el caribe colombiano en el cual la raza Katahdin presenta un valor de 66.3%, mientras la raza Dorper presenta un valor superior con el 69.4%, sin embargo, el método de extracción también influye en la motilidad, respecto a esto también menciona que existe una mayor motilidad individual con vagina artificial (72.4%), a diferencia de utilizar un electro eyaculador (68.4%). Por otro lado, Escudero (2015) reporta una motilidad individual del 99% en la raza Corriedale.

En cuanto a la motilidad individual post congelación según los datos reportados por Chunata (2019), en su investigación reportó diferencias significativas en las muestras evaluadas, mostrando un mayor movimiento las muestras de la raza Black Belly con el (78.4%) a diferencia de la raza Pelibuey con el (64.2%); mientras Cervera *et al.* (2013), encontró una motilidad individual de 67.2% post congelación en ovinos de raza Katahdin; finalmente Rodríguez *et al.* (2008), menciona en su estudio que la motilidad espermática en carneros Black Belly y Pelibuey presentaron un promedio de (71.5%) en las muestras post congelación. Pillajo (2015) menciona en su investigación realizada evaluando los parámetros macroscópicos del semen de ovinos de la raza Poll Dorset un porcentaje del 46,3% con un diluyente Andromed presentando este una menor eficiencia, sin embargo, el mejor rendimiento estuvo presente en el tratamiento considerando el diluyente Triladyl® con el 73.3%.

7.6. Viabilidad espermática

En cuanto a la viabilidad espermática, Carrascal *et al.* (2018), reporta en su investigación de ovinos de raza Pelibuey bajo condiciones ambientales en el caribe colombiano, que en el caribe húmedo presenta un valor del 74% y en el caribe seco fue de 77.5%, en cuanto a las razas evaluadas existe una mayor viabilidad en la Santa Inés con el 76.4%, y con un 73% en la raza Katahdin, mientras, Rodríguez (2007), menciona que al crio conservar la muestra cerca del 60% de los espermatozoides presentan movimiento luego de la

descongelación, por otro lado Pillajo (2015) reporta en su estudio realizado en ovinos criollos en el subtrópico que la vitalidad espermática presentó un valor de 74.8%.

Por otro lado, Gómez (2020) en su investigación realizada en la categorización de la crio conservación de semen ovino en carneros de raza Black Belly y Pelibuey en la cual se crio conservo con diluyente Triladyl y yema de huevo, se pudo determinar que a las 24 horas se logró obtener una viabilidad del 47.84% post congelación.

Al adicionar en el diluyente Triladyl® un surfactante en la crio conservación de semen Katahdin logró obtener una viabilidad espermática del 23.83% luego de los 17 días de conservación como indica Cervera *et al.* (2013), mientras Pillajo (2015) en su investigación realizada en la evaluación de características macroscópicas de semen de la raza Corriedale y Poll Dorset menciona que en cuanto a la raza como factor de estudio ambas lograron obtener el 22.5%, sin embargo, en cuanto a la utilización de diluyentes el mejor tratamiento se encontró al utilizar el diluyente Triladyl® con el 27.6%.

8. Conclusiones

- Las características macro y microscópicas del semen entre los carneros Katahdin no presentan diferencias significativas antes de aplicar los niveles de cafeína al diluyente de conservación (Triladyl®) y dichos parámetros se encuentran dentro de los rangos manifestados en la literatura.
- La aplicación de los distintos niveles de cafeína a los medios de crio conservación presentó diferencias significativas sobre las características espermáticas en el semen de los carneros de pelo en las características microscópicas después de la crioconservación.
- En cuanto a la motilidad individual presentó un mejor desempeño el T2 (2mg de cafeína) con un promedio de 51.3%, en comparación con el T3 (3 mg de cafeína) con un promedio de 21,3% siendo este el tratamiento con menor resultado.
- En cuanto a la vitalidad espermática post descongelación el T2 (2mg de cafeína) también arrojó los mejores resultados con un promedio de 70.5%, mientras el tratamiento con menor resultado fue el T3 (3 mg de cafeína) con promedio de 29.1%.
- Se determinó una correlación negativa entre las variables: motilidad individual y vitalidad espermática vs los niveles de cafeína (tratamientos), pues mientras mayor fue la dosis de cafeína existió una menor motilidad individual y vitalidad espermática.

9. Recomendaciones

- La presente investigación reportó datos favorables con respecto a la adición de 2mg de cafeína, pues este tratamiento presentó los mejores resultados en cuanto a calidad espermática post descongelación por lo que se recomienda estos niveles de cafeína para procesos de criocongelación en diferentes razas de ovinos.
- Replicar la investigación considerando otros ambientes, otras razas y otros sistemas de manejo a fin de poder visualizar si existen diferencias entre las variables de estudio, así como la utilización de otros diluyentes con el fin de observar si existe alguna alteración o mejoría de los resultados obtenidos en la presente investigación.

10. Bibliografía

- Agarwal, A., Mulgund, A., Alshahrani, S., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2014). *Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia*. *Reproductive biology and endocrinology*, 12, 1-8.
- Agarwal A. & Bui AD. *Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility*. 2017;385–99.
- Aisen, E. (2024). *Reproducción Ovina y Caprina*. Intermédica.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. "Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine." *Molecular Reproduction and Development*. 1997 Aug;47(4):468-82. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199708)47:4<468::AID-MRD14>3.0.CO;2-S.
- Arancibia-Hernández, Y. L., Loyola-Mondragón, D. Y., Yaquelin, E., & Hernández-Cruz, J. P. C. (2022). *Especies reactivas de oxígeno y antioxidantes: Aspectos básicos*.
- Bailey, J. Y Buhr, M. 1994. Cryopreservation alters the Ca flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 45-51.
- Barakat, I. A. H., Danfour, M. A., Galewan, F. A. M., & Dkhil, M. A. (2015). *Effect of Various Concentrations of Caffeine , Pentoxifylline , and Kallikrein on Hyperactivation of Frozen Bovine Semen*. 2015.
- Camargo, O., Ramírez, J., & Oliveira, M. (1999). *Radicales libres y desarrollo embrionario*. *Rev Col Cienc Pec*, 12(2), 108–118
- Carrascal Triana, E. L., Herrera Pérez, N., Salcedo Carrascal, E. P., & García Jiménez, J. A. (2018). *Características seminales de ovinos bajo condiciones ambientales del Caribe Colombiano*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(3), 1–12. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/21611>
- Christova, Y., James, P. S., & Jones, R. (2004). *Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals*. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 68(3), 365-372.
- Chunata, S. V., Díaz, H., & Hernández, E. W. (2022). Valoración del contenido seminal de dos razas ovinas tropicales y dos tipos de diluyentes para su crioconservación. *RECIENA*, 2(1), 45-54. <https://doi.org/10.47187/52nb5807>
- Cueto, M. I., Gibbons, A. E., García Vinent, J., Wolff, M., & Arrigo, J. (2016). *Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino*.

- Diaz, M., & Arvelo, A. (21 de Junio de 2005). Semantic Scholar. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Estudio-del-metabolismo-energ%C3%A9tico-de-los-porcinos-D%C3%ADaz-Arvelo/399e3c6e9f9a16159e1cbeb51fcef56217bcb750>
- Escudero Pozo, J. L. (2015). *Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales* [Tesis de Pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5256/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Evans, G. W.C. Maxwell.. Salamons. 1990. *Inseminación artificial en ovejas y cabras*. Editorial Acriba. S.A. Z
- Ford, W. C. L. (2001). *Reactive oxygen species and sperm*. *Human Fertility*, 4, 77–78.
- Freeman BA & Grapo JD. (1982). Biology of disease Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-426.
- Gadea, J., Guambo, D., Cánovas, S., & Grullón, L. (2007). *Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa*. 40–49. Obtenido de: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00756.x>
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S. (2004). *Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. *Theriogenology*. 62(3-4), 690–701.
- García, B. M., Fernández, L. G., Ferrusola, C. O., Tapia, J. A., Morcuende, D., & Peña, F. J. (2011). *Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa*. *Theriogenology*, 75(5), 811–818.
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2000). *Spermatozoa and seminal plasma*. *Reproduction in farm animals*, 96-109.
- Gómez, V. J. C., Cuicas, H. R., Jáuregui, P. I., Gutiérrez, S. I., Ulloa, A. R., & Urban, D. D. (2020). *Determinación de la congelabilidad de carneros de pelo (Pelibuey-Blackbelly) de acuerdo con la viabilidad y cinética espermática*. *Spermova*, 10, 26-31

- Guerrero, H., Huanca, W., Raymundo, F., Huerta, S., y Ramos, D. (2009). *Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 20(1), 41-46.
- Hafez, E. S. F (2004). *Reproducción e inseminación en animales* 7ª ed. McGraw-Hill. EE. UU
- Hamid, I. S. (2018). *Effect of adding different levels of caffeine in the extender on some biochemical constituents, enzymatic activities and physical characteristics of chilled and frozen ram semen*. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 225-233. Anexos.
- Harman D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5(5), 557–61.
- Hernández, P., Fernández, R., Rodríguez, S., Juárez, R., Soto, M., y García, R. (2012). *Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status*. *Revista De Salud Animal*, 34(2), 78. Recuperado a partir de <https://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/22>
- Izquierdo, A., y Iglesias, A. (18 de Diciembre de 2020). Semantic Scholar. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/El-estr%C3%A9s-oxidativo-en-la-fertilidad-y-desempe%C3%B1o-de-Izquierdo-Iglesias/d8361c7c17128ef6a7c9587a894b10956c4f3f52>
- Izquierdo, A. C., Lang, C. G. R., Jiménez, C. A. C., Jiménez, M. S. C., Liera, J. E. G., Denis, B. E. R., y Salinas, K. A. (2009). *Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática/oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation*. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1.
- Jimenez, M. (1 de Diciembre de 2005). Semantic Scholar. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Estr%C3%A9s-oxidativo-y-el-uso-de-antioxidantes-en-Jim%C3%A9nez-Cerrilla/9cb22033436d55162ceec9d079b9436b51b8b284>
- Lavranos, G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. *Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways*. *Reprod Toxicol*. 2009;34(3):298–307.
- López, J. R., Aké-Villanueva, N. Y., Segura-Correa, J. C., Aké-Villanueva, J. R., y Montes-Pérez, R. C. (2016). *Efecto de la edad y la época sobre las características seminales y la capacidad de servicio en carneros Pelibuey bajo condiciones tropicales*. *Livestock Research for Rural Development*, 28(9). Recuperado de <https://www.lrrd.org/lrrd28/9/akel28166.htm>

- Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscos CM.(2008). *Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa*. Anim Reprod Sci. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.007. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18499366.
- Miquel J. (1991). *An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells*. Archives of Gerontology and Geriatrics. 12(2-3), 99–117
- Muhammad, A (Cervera et al., 2013)., 2002. *Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility*, Biology of Reproduction. 66: 354-360.
- Neill, A., & Masters, C. (1972). *Semantic Scholar*. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Metabolism-of-fatty-acids-by-ovine-spermatozoa.-Neill-Masters/35f3637b797b1b5e33f3e6f5382298c30f920f53>
- Nieto, R., Saldaña, P., Hernández, B. & Jiménez, R. (2021). *Adición de la pulpa de café en la dieta de ovinos y su efecto en las características seminales*. Revista Académico – Científica TECTZAPIC. <https://www.eumed.net/es/revistas/tectzapic/vol-7-no-2-diciembre-2021/dieta-ovinos>
- Núñez Selles A. *Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidante: retos y oportunidades*. Rev Cuba Salud Pública. 2011;37(Ldl):644–60.
- Peña, F. J., Ortiz-Rodríguez, J. M., Gaitskell-Phillips, G., Gil, M. C., Ortega-Ferrusola, C., & Martín-Cano, F. E. (2021). *"An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis–Krebs cycle–oxidative phosphorylation)"*. Animal Reproduction Science, 246, 106805
- Pérez, E., & Nichi, M. (22 de Febrero de 2013). *Semantic Scholar*. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Efeito-da-adi%C3%A7%C3%A3o-de-Glutationa-na-fun%C3%A7%C3%A3o-e-estresse-Perez-Nichi/a705d77aee4d50c1ee4b19b47246b90a067094b1>
- Pillajo, L. A. (2015). *Evaluación de tres diluyentes comerciales en la criopreservación de semen ovino de las razas Poll Dorset y Corriedale* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio ESPOCH. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/items/4736116d-7484-44ec-b990-ab051d3d1ffe>

- Quito, J. E. P., Alvarado, J. C. A., Piedra, A. L. M., & Cornejo, M. E. M. (2025). *Evaluación de tres dilutores comerciales sobre el semen de ovino post-congelación*. Polo del Conocimiento, 10(1), 2542-2566.
- Ramírez, E. A. (2019). *Efectividad del uso de semen congelado adicionado con extracto antioxidante de nopal en la inseminación artificial por laparoscopia en ovejas*.
- Ramos L & Wetzels AM. (2001). *Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay*. Human Reproduction. 16(8), 1703–7.
- Rodríguez-Almeida, Felipe A., Ávila Cota, Carlos O., Anchondo Garay, Alfredo, Sánchez-Ramírez, Blanca, & Jiménez Castro, Jorge A.. (2008). *Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado*. Agrociencia, 42(4), 399-406. Recuperado en 19 de abril de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400002&lng=es&tlng=es.
- Ruiz, L. (30 de Enero de 2012). *Semantic Scholar*. Obtenido de [https://www.semanticscholar.org/paper/EFFECTO-DE-DOS-ANTIOXIDANTES-\(TEMPO-Y-TEMPOL\)-EN-LA-LuisRuiz-AlexeiSantiani/fde27224d679c72582d5ae978d914bf4255882d7](https://www.semanticscholar.org/paper/EFFECTO-DE-DOS-ANTIOXIDANTES-(TEMPO-Y-TEMPOL)-EN-LA-LuisRuiz-AlexeiSantiani/fde27224d679c72582d5ae978d914bf4255882d7)
- Ruiz G., L., Santiani A., A., Sandoval M., R., Huanca L., W., Delgado C., A., Coronado S., L., & Alzamora P., C. (2012). *Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris*. Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú, 18(2), 99-106. <https://doi.org/10.15381/rivep.v18i2.1284>.
- Sánchez Herrera, R. M. (2024). *Efecto de cafeína y glutatión adicionados al medio de criopreservación sobre los parámetros de calidad seminal y en la tasa de concepción en bovinos lecheros* [Tesis de Maestría, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/20484/1/20T01861.pdf>
- Sandoval M., Rocío, Santiani A., Alexei, Ruiz G., Luis, Leyva V., Víctor, Coronado S., Luis, & Delgado C., Alfredo. (2012). *Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 18(2), 107-114. Recuperado en 18 de abril de 2025, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172007000200004&lng=es&tlng=es.

- Sariözkan, S., Numan, M., Barbaros, P., Ulutas, P. A., & Bilgen, A. (2009). Cryobiology *The influence of cysteine and taurine on microscopic – oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation* q. 58, 134–138. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.006>
- Sies H & Cadenas E. (1985). *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 311:617–31.
- Stephens, T. D., R. M. Brooks, J. L. Carrington, L. Cheng, A. C. Carrington, C. A. Porr y R. K. Splan. 2013. *Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen*. J. Equine Vet. Sci. 33: 615-621.
- Tapia Jácome, L. E. (2014). *Valoración seminal en ovinos de raza Corriedale y mestizos en la parroquia Cochapamba del cantón Saquisilí* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio UTC.
- Torres R, F., Manjarrez, C. I., Carvajal S, M., & Grajales L, H. A. (2019). *Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino*. Revista de Medicina Veterinaria, (38), 101-109.
- Tortolero, I., Arata, G., Osuna, J., Gómez, R., & Regadera, J. (2005). *Estrés oxidativo y función espermática*. Revisión. Rev Venezolana de Endocrinología Y Metabolismo, 3(3), 12–19. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102005000300003bn
- Towns, K. M., & Luke, R. K. J. (1976). *Measurement of adenylate cyclase activity in ram spermatozoa*. Reproduction, 47(2), 355-357.
- Valdez Jojoa, D. (2013). *Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado*.
- Vazquez L, M. H., Marín Briggiler, C. I., Cetica, P., Dalvit, G., Caballero, J. N., & Arzondo, M. M. (2012) *Eficaz selección de espermatozoides bovi-nos criopreservados usando filtración por columnas de lana de vidrio*.
- Viteri Zapata, W. F. (2015). *Aplicación de técnicas de biotecnología reproductiva en la sincronización de estro e inseminación artificial en ovinas mestizas* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio ESPOCH. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4479>
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., & Loughlin, K. R. (1997). *Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation*. Urology, 49(6), 921-925.

- Watson, P. 2000. *The causes of reduced fertility with cryopreserved Semen*. Anim.Repro Sci. 60-61, 481-492.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. (2002). *Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm*. Molecular Human Reproduction. 8(11), 984–91
- Wilde, R., de la Vega, A. & Cruz, M. (2004). *Efecto de la adición de cafeína y lactato sobre la motilidad del semen equino diluido en leche descremada-glucosa*. Zootecnia Tropical, 22(1), 101-112.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692004000100007&lng=es&tlng=es.
- Zayas, L. (1 de Diciembre de 2000). Semantic Scholar. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Papel-del-estr%C3%A9s-oxidativo-en-la-infertilidad-Zayas-Ben%C3%ADtez/9a84631a67c648ceca85b064ed705630877d39d3>

11. Anexos

Anexo 1. Colecta de semen ovino Katahdin.

Armado de la vagina artificial



Colecta de semen ovino



Anexo 2. Evaluación macroscópica de semen fresco.

Volumen de eyaculado (ml)



Color

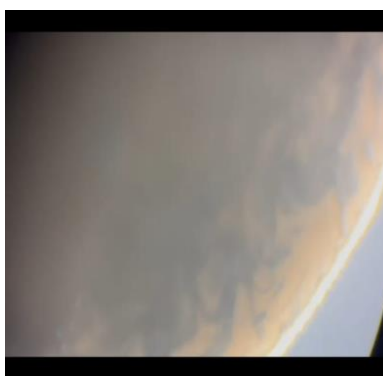


pH



Anexo 3. Evaluación microscopica pre – congelación.

Motilidad Masal



Motilidad Individual



Viabilidad Espermática



Anexo 4. Preparación del diluyente.

Diluyente Triladyl ®



Anexo 5. Adición de la cafeína anhídrida.



Anexo 6. Envasado y sellado

Pajillas de 0.25ml



Anexo 7. Fase de refrigeración

Pajuelas a 4° C por 2 horas



Anexo 8. Fase de congelación



Anexo 9. Evaluación microscópica post congelación.

Motilidad Individual



Vitalidad Espermática



Anexo 10. Valoración macroscópica de semen fresco

SEMEN FRESCO											
Carnero (Katadyn)	Volumen (ml)			Promedio	Color			pH			
	1	2	3		1	2	3	1	2	3	promedio
M1 (Mateo)	2	1.5	0.8	1.4	blanco cremoso	blanco cremoso	blanco cremoso	7	7.5	7.5	7.3
M2 (Jefe)	2	1	0.8	1.4	blanco lechoso	blanco cremoso	blanco lechoso	8	7.5	7.5	7.7
				1.4							7.5

Anexo 11. Valoración microscópica de semen pre – congelado

SEMEN PRE CONGELADO											
Carnero (Katadyn)		Motilidad individual %				Carnero (katadyn)		Viabilidad %			
		1	2	3	promedio			1	2	3	promedio
M1 (Mateo)		70%	80%	80%	77%	M1 (Mateo)		70%	80%	80%	77%
M2 (Jefe)		60%	70%	70%	67%	M2 (Jefe)		60%	70%	70%	67%
					72%						72%

Anexo 12. Valoración microscópica post - congelación

SEMEN POST - CONGELADO								
Tratamiento 0 (T0)								
Carnero (Katadyn)	Motilidad Individual %			Promedio	Vitalidad %			Promedio
	1	2	3		1	2	3	
				49.2%	38.09% muertos 61.90% vivos	37.93% muertos 62.06% vivos	35.29% muertos 64.70% vivos	62.89%
M1 (Mateo)	50%	50%	60%					
	40%	40%	50%					
	50%	50%	60%					
	40%	50%	50%					
Promedio	45%	48%	55%					
M2 (Jefe)	30%	30%	40%	37.5%	60% muertos 40% vivos	57.76% muertos 42.24% vivos	52.2% muertos 47.8%vivos	43.3%
	30%	40%	50%					
	30%	40%	40%					
	40%	40%	40%					
Promedio	33%	38%	43%					
				43.3%				53.1%

Tratamiento 1 (T1)								
Carnero (Katadyn)	Motilidad Individual %			Promedio	Vitalidad %			Promedio
	1	2	3		1	2	3	
M1 (Mateo)	40%	60%	50%	48.3%	53.84% muertos 46.15% vivos	35.29% muertos 64.70% vivos	37.93% muertos 62.06% vivos	57.6%
	50%	60%	50%					
	50%	50%	40%					
	30%	50%	50%					
Promedio	43%	55%	48%					
M2 (Jefe)	30%	30%	40%	30%	61.98% muertos 38.01% vivos	54.38% muertos 45.61% vivos	46.78% muertos 53.22% muertos	45.6%
	20%	40%	30%					
	20%	20%	30%					
	30%	30%	40%					
Promedio	25%	30%	35%					
				39.2%				51.6%

Tratamiento 2 (T2)								
Carnero (Katadyn)	Motilidad Individual %			Promedio	Vitalidad %			Promedio
	1	2	3		1	2	3	
M1 (Mateo)	50%	60%	70%	63.3%	22.85% muertos 77.14% vivos	19.35% muertos 80.64% vivos	14.28% muertos 85.71%vivos	81.2%
	70%	70%	80%					
	50%	60%	60%					
	60%	60%	70%					
Promedio	58%	63%	70%					
M2 (Jefe)	50%	40%	40%	39.2%	39.17% muertos 60.83% vivos	46.78% muertos 53.22% vivos	34.6% muertos 65.4% vivos	59.8%
	40%	30%	40%					
	30%	40%	50%					
	40%	30%	40%					
Promedio	40%	35%	43%					
				51.3%				70.5%

Tratamiento 3 (T3)								
Carnero (Katadyn)	Motilidad Individual %				Vitalidad %			Promedio
	1	2	3		1	2	3	
M1 (Mateo)	20%	20%	30%	24.2%	65.78% muertos 34.21% vivos	76.31%muertos 23.68% vivos	57.5% muertos 42.5% vivos	33.5%
	30%	20%	30%					
	20%	20%	30%					
	30%	20%	20%					
Promedio	25%	20%	28%					
M2 (Jefe)	10%	10%	20%	18.3%	82.21% muertos 17.76% vivos	78.68% muertos 21.31% vivos	65.08% muertos 34.91% vivos	24.7%
	10%	20%	20%					
	20%	20%	20%					
	20%	20%	30%					
Promedio	15%	18%	23%					
				21.3%				29.1%

Anexo 13. Pruebas Estadísticas

PRUEBA DE MANOVA, por ser dos variables de estudio

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error^a

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Motilidad (porcentaje)	Se basa en la media	4,413	3	20	,015
	Se basa en la mediana	4,279	3	20	,017
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,279	3	16,820	,020
	Se basa en la media recortada	4,411	3	20	,015
Vitalidad (porcentaje)	Se basa en la media	,530	3	20	,667
	Se basa en la mediana	,467	3	20	,709
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,467	3	17,458	,709
	Se basa en la media recortada	,530	3	20	,667

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Diseño : Intersección + Tratamiento

Pruebas multivariante^a

Efecto		Valor	F	gl de hipótesis	gl de error	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Intersección	Traza de Pillai	,964	258,052 ^b	2,000	19,000	,000	,964
	Lambda de Wilks	,036	258,052 ^b	2,000	19,000	,000	,964
	Traza de Hotelling	27,163	258,052 ^b	2,000	19,000	,000	,964
	Raíz mayor de Roy	27,163	258,052 ^b	2,000	19,000	,000	,964
Tratamiento	Traza de Pillai	,883	5,270	6,000	40,000	,000	,442
	Lambda de Wilks	,245	6,455 ^b	6,000	38,000	,000	,505
	Traza de Hotelling	2,554	7,663	6,000	36,000	,000	,561
	Raíz mayor de Roy	2,330	15,532 ^c	3,000	20,000	,000	,700

a. Diseño : Intersección + Tratamiento

b. Estadístico exacto

c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Modelo corregido	Motilidad (porcentaje)	,290 ^a	3	,097	9,505	,000	,588
	Vitalidad (porcentaje)	,520 ^b	3	,173	14,444	,000	,684
Intersección	Motilidad (porcentaje)	3,604	1	3,604	354,104	,000	,947
	Vitalidad (porcentaje)	6,260	1	6,260	522,072	,000	,963
Tratamiento	Motilidad (porcentaje)	,290	3	,097	9,505	,000	,588
	Vitalidad (porcentaje)	,520	3	,173	14,444	,000	,684
Error	Motilidad (porcentaje)	,204	20	,010			
	Vitalidad (porcentaje)	,240	20	,012			
Total	Motilidad (porcentaje)	4,098	24				
	Vitalidad (porcentaje)	7,020	24				
Total corregido	Motilidad (porcentaje)	,494	23				
	Vitalidad (porcentaje)	,759	23				

a. R al cuadrado = ,588 (R al cuadrado ajustada = ,526)

b. R al cuadrado = ,684 (R al cuadrado ajustada = ,637)

Comparaciones múltiples								
Variable dependiente		(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
							Limite inferior	Limite superior
Motilidad (porcentaje)	Games- Howell	Tratamiento control	Tratamiento uno	,041667	,0560258	,877	-,133490	,216824
			Tratamiento dos	-,079167	,0656432	,641	-,290292	,131959
			Tratamiento tres	,220833*	,0373144	,001	,101848	,339819
		Tratamiento uno	Tratamiento control	-,041667	,0560258	,877	-,216824	,133490
			Tratamiento dos	-,120833	,0734327	,400	-,347418	,105751
			Tratamiento tres	,179167*	,0497564	,037	,012323	,346010
		Tratamiento dos	Tratamiento control	,079167	,0656432	,641	-,131959	,290292
			Tratamiento uno	,120833	,0734327	,400	-,105751	,347418
			Tratamiento tres	,300000*	,0603807	,010	,092032	,507968
		Tratamiento tres	Tratamiento control	-,220833*	,0373144	,001	-,339819	-,101848
			Tratamiento uno	-,179167*	,0497564	,037	-,346010	-,012323
			Tratamiento dos	-,300000*	,0603807	,010	-,507968	-,092032
Vitalidad (porcentaje)	Games- Howell	Tratamiento control	Tratamiento uno	,014917	,0617477	,995	-,174143	,203976
			Tratamiento dos	-,173733	,0684663	,114	-,383864	,036398
			Tratamiento tres	,240550*	,0596656	,011	,057342	,423758
		Tratamiento uno	Tratamiento control	-,014917	,0617477	,995	-,203976	,174143

			Tratamiento dos	-,188650	,0665904	,074	-,393817	,016517
			Tratamiento tres	,225633*	,0575033	,013	,049524	,401743
		Tratamiento dos	Tratamiento control	,173733	,0684663	,114	-,036398	,383864
			Tratamiento uno	,188650	,0665904	,074	-,016517	,393817
			Tratamiento tres	,414283*	,0646644	,001	,213822	,614745
		Tratamiento tres	Tratamiento control	-,240550*	,0596656	,011	-,423758	-,057342
			Tratamiento uno	-,225633*	,0575033	,013	-,401743	-,049524
			Tratamiento dos	-,414283*	,0646644	,001	-,614745	-,213822

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,012.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

Se realiza prueba de Games-Howell, por cuanto no se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas, y se aplican comparaciones múltiples para determinar entre que grupos, hay diferencias significativas o no existen.