

Uso de antioxidantes en el diluyente y su eficacia sobre la calidad de semen ovino durante la
criopreservación

Mabel Natalia Correa Bermúdez, Fabian Humberto Sisa Ortiz

Trabajo de Grado para Optar al Título de Zootecnista

Director

Daniel Felipe Torres Ruda

Msc.Zootecnista

Codirector

Nilson Ovidio Vargas Romero

Zootecnista

Universidad Industrial de Santander

Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia

Programa de Zootecnia

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

Dedicamos este trabajo con todo nuestro amor y gratitud a nuestros padres, quienes han sido nuestra guía, nuestro ejemplo de vida y el mayor soporte en este camino. Gracias a su esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional, hoy podemos ver materializado este logro que también les pertenece. Ellos nos enseñaron que los sueños se alcanzan con disciplina, humildad y constancia; que cada caída es una oportunidad para levantarse con más fuerza y que el verdadero éxito no se mide solo en metas alcanzadas, sino en el camino recorrido y en las personas que lo hacen posible. Por todo ello, este triunfo no es únicamente nuestro, sino de quienes nos formaron con valores y nos mostraron que creer en uno mismo es la primera victoria.

A nuestra familia en general, por acompañarnos con paciencia, comprensión y palabras de aliento en los momentos de cansancio y dificultad, recordándonos siempre la importancia de mantenernos firmes en nuestras metas.

Dedicamos también este triunfo a nuestros amigos más cercanos, quienes, con su compañía, ánimo y confianza nos brindaron fuerzas para continuar y hacer de este proceso un trayecto más llevadero.

Finalmente, lo dedicamos a todas las personas especiales que de una u otra manera estuvieron presentes en este recorrido, pues cada gesto de apoyo y cada palabra de motivación nos inspiraron a dar lo mejor de nosotros y culminar con éxito esta etapa de nuestras vidas.

Agradecimientos

Agradecemos en primer lugar a Dios, por guiarnos y brindarnos fortaleza durante el desarrollo de este proceso académico. De manera especial, expresamos nuestra gratitud a nuestras familias y a todas aquellas personas que, de una u otra forma, nos ofrecieron su apoyo moral y académico, siendo fundamentales para la culminación de este trabajo.

Extendemos nuestros más sinceros agradecimientos al Centro Agroempresarial y Turístico de los Andes, SENA, por el respaldo institucional y los recursos brindados para la realización de esta investigación; así como al equipo del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Sanidad Animal (BRSA), por su disposición, acompañamiento y colaboración durante el desarrollo de las actividades experimentales. De igual manera, agradecemos al equipo de trabajo de la Granja Los Andes, por su valiosa ayuda y compromiso en la fase de campo, contribuyendo de manera significativa al desarrollo de esta investigación.

Finalmente, reconocemos el valioso apoyo de nuestro director, Daniel Felipe Torres Ruda, y codirector, Nilson Ovidio Vargas Romero, quienes con su orientación, conocimientos y compromiso contribuyeron de manera significativa al cumplimiento de los objetivos planteados en esta investigación.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	15
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2. Marco teórico	18
2.1 Macho ovino	18
2.2 Pubertad	18
2.3 Desarrollo adulto	18
2.4 Semen ovino.....	19
2.4.1 Características del semen.....	19
2.4.2 Espermatogénesis	19
2.4.3 Composición del plasma seminal	20
2.5 Mecanismos de evaluación del semen.....	20
2.5.1 Análisis macroscópico	20
2.5.2 Análisis microscópico.....	21
2.5.3 Análisis computarizado.....	21
2.6 Procesos de congelación	21
2.6.1 Uso de diluyentes comerciales	22
2.6.2 Enriquecimiento de diluyentes	22

2.6.2.1 Productos naturales.....	23
2.6.2.2 Productos Químicos.....	23
2.7 Tipos de estrés durante la congelación	23
3. Metodología	24
3.1 Área de estudio.....	24
3.2 Unidades experimentales	25
3.3 Colección de semen.....	25
3.4 Evaluación del semen	25
3.5 Preparación de la dilución del semen	26
3.5.1 Proceso de dilución.....	26
3.5.2 Criopreservación	27
3.6 Análisis estadísticos de los resultados	27
4. Resultados y discusión.....	28
5. Conclusiones y recomendaciones.....	46
Referencias bibliográficas	48
Apéndices.....	54

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Variables de cinemática espermática.....	43

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Ubicación Granja los Andes, SENA.	24
Figura 2 Eyaculado inicial.	28
Figura 3 Viabilidad espermática.	29
Figura 4 Espermatozoide ovino con cabeza piriforme.	30
Figura 5 Espermatozoide ovino con pieza intermedia doblada.	30
Figura 6 Espermatozoide ovino con pieza intermedia engrosada.	31
Figura 7 Espermatozoide ovino con gota citoplasmática residual.	31
Figura 8 Espermatozoide ovino con cola enrollada.	32
Figura 9 Espermatozoide ovino con cola fracturada.	32

Lista de Gráficas

	Pág.
Gráfica 1 Motilidad.....	34
Gráfica 2 Motilidad Progresiva.....	35
Gráfica 3 Velocidad curvilínea VCL	36
Gráfica 4 Velocidad promedio de trayectoria VAP	37
Gráfica 5 Velocidad rectilínea VSL.....	39
Gráfica 6 Rectitud SRT	40
Gráfica 7 Linealidad LIN	41
Gráfica 8 Variables de cinemática espermática	44
Gráfica 9 Velocidad rectilínea VSL.....	45

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A: Protocolo de trabajo de campo para recolección de semen ovino.....	54
Apéndice B: Protocolo de laboratorio para la evaluación del efecto de antioxidantes (Vitamina E y GSH) en la criopreservación de semen ovino.....	57

Glosario

Antioxidantes: Son compuestos que neutralizan especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan durante la criopreservación; en ovinos, su adición a los diluyentes mejora la motilidad y la viabilidad espermática, según Wu et al. (2021) y Berean et al. (2024).

Carnero: Es un macho adulto de la especie ovina, el cual es utilizado como donante en programas de reproducción y criopreservación seminal; su calidad seminal determina en gran medida el éxito de la inseminación artificial (Ceva Salud Animal, 2024).

Criopreservación: Técnica que consiste en congelar y almacenar semen en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), proceso que causa daños celulares por estrés oxidativo y osmótico si no se emplean antioxidantes adecuados. (Berean et al., 2024; Avdatek et al., 2024).

Diluyente seminal: Medio que aporta nutrientes, mantiene el pH y protege a los espermatozoides frente al daño durante el enfriamiento y la congelación; los modernos incluyen liposomas o soya en reemplazo de yema de huevo. (Mujitaba et al., 2024).

Eyaculado: El semen eyaculado es una mezcla de espermatozoides y fluidos provenientes de los testículos, las vías de conducción y las glándulas accesorias. Su composición varía según la especie y factores como la edad y la salud del animal, (R.Vet., 2023).

Fertilidad: Capacidad del semen de producir gestación en la hembra; depende de la calidad seminal, especialmente de la motilidad, viabilidad e integridad acrosómica post-descongelación. (Spanner et al., 2024).

Glutación reducido (GSH): El glutación es un antioxidante presente en plantas, animales, hongos y algunas bacterias y arqueas, protegiendo las células del daño causado por especies reactivas de oxígeno, radicales libres, peróxidos, peróxidos de lípidos y metales pesados (AcademiaLab, 2023).

Morfología espermática: Evaluación de la forma y estructura de los espermatozoides, donde se consideran normales o anormales; un alto porcentaje de anomalías reduce la fertilidad. (Zhu et al., 2023).

Motilidad espermática: Capacidad de movimiento de los espermatozoides, indicador esencial de fertilidad; la criopreservación disminuye este parámetro, pero algunos antioxidantes pueden conservarlo. (Wu et al., 2021; Spanner et al., 2024).

Nitrógeno líquido: Según Ferrovial (2023) el nitrógeno líquido es simplemente nitrógeno que ha pasado de su estado gaseoso natural a estado líquido y que permite almacenar semen a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, deteniendo el metabolismo celular y asegurando conservación a largo plazo. (Berean et al., 2024).

Oxidación lipídica: es el proceso mediante el cual los lípidos de las membranas celulares son dañados por especies reactivas de oxígeno, afectando la integridad de los espermatozoides. Este daño es crítico en la criopreservación, ya que puede disminuir la viabilidad y funcionalidad espermática, (Zhu et al., 2023).

Plasma seminal: según la Revista Genética Bovina (2021), el plasma seminal es una fracción líquida del semen que contiene una compleja mezcla de proteínas, enzimas y antioxidantes naturales que se originan principalmente en el tejido testicular, epidídimo y las glándulas sexuales accesorias. Estas sustancias también influyen en la criotolerancia y viabilidad de los espermatozoides (Berean et al., 2024)

Pubertad (en ovinos): Etapa en que el carnero adquiere capacidad reproductiva funcional, caracterizada por la producción de espermatozoides fértiles. (López et al., 2022).

Reacción acrosómica: Evento en el cual el acrosoma libera enzimas necesarias para penetrar la zona pelúcida; la criopreservación puede dañarla, reduciendo la fertilidad. (Zhu et al., 2023).

Semen descongelado: Muestra de semen previamente criopreservada y luego calentada para su uso; presenta menor calidad que el semen fresco. (Wu et al., 2021).

Semen fresco: Eyaculado recientemente recolectado, no sometido a criopreservación, utilizado como referencia para comparar daños post-descongelación. (Wu et al., 2021).

Viabilidad espermática: Porcentaje de espermatozoides vivos en una muestra; disminuye tras congelación, pero puede mejorarse con antioxidantes. La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable, según CONtexto Ganadero (2023) y Zhu et al. (2024)

Vitamina E: Antioxidante liposoluble que protege los lípidos de membrana contra la peroxidación, mejorando la motilidad y viabilidad en semen criopreservado. (Akhter et al., 2023; Berean et al., 2024).

Vagina artificial: Dispositivo que simula el aparato reproductor de la hembra y permite recolectar semen de manera controlada en carneros. (Wu et al., 2021).

Volumen seminal: Cantidad total de semen en un eyaculado, expresada en mililitros; se considera un parámetro macroscópico de calidad seminal. (Pereira das Neves Snoeck et al., 2023).

Resumen

Título: Eficacia de antioxidantes en el diluyente sobre la calidad de semen ovino durante la criopreservación*

Autores: Mabel Natalia Correa Bermúdez y Fabian Humberto Sisa Ortiz **

Palabras Clave: Reproducción, Cinemática, peroxidación lipídica.

Descripción:

La criopreservación de semen ovino es un medio esencial para el mejoramiento genético y la biotecnología reproductiva; sin embargo, los procesos de congelación y descongelación provocan estrés oxidativo, daño de membrana y reducción de los parámetros seminales. Esta investigación evaluó la eficacia de la adición de antioxidantes al diluyente comercial Optixcell® sobre la calidad espermática en ovinos de la Granja Los Andes, SENA CATA. Se utilizaron tres machos adultos mantenidos en condiciones de semiestabulación, los cuales fueron colectados a través de vagina artificial. Se conformó un pool seminal y se establecieron tres tratamientos: T0 (Optixcell®), T1 (Optixcell® + Vitamina E a 2 mM) y T2 (Optixcell® + Glutación reducido a 5 mM). Las muestras fueron procesadas bajo protocolos estandarizados de criopreservación y evaluadas mediante análisis macroscópicos y microscópicos. Los resultados evidenciaron que la adición de antioxidantes influyó positivamente en la preservación de parámetros espermáticos, en comparación con el tratamiento control. En particular, la vitamina E mostró mejoras en los parámetros de cinemática espermática especialmente en la VCL. Estos hallazgos confirman que la adición de antioxidante en diluyentes puede mitigar los efectos del estrés oxidativo, optimizando la calidad seminal tras la descongelación. Se recomienda profundizar en la estandarización de concentraciones, validar y ajustar los protocolos de criopreservación en cada etapa del proceso y ampliar el estudio con un mayor número de animales y repeticiones experimentales, con el fin de fortalecer la evidencia estadística y favorecer la confiabilidad de los hallazgos.

* Trabajo de Grado

** Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia IPRED. Programa de Zootecnia. Director: Daniel Felipe Torres Ruda. Msc. Zootecnista. Codirector: Nilson Ovidio Vargas Romero. Zootecnista.

Abstract

Title: Efficacy of Antioxidants in the Extender on Ram Semen Quality during Cryopreservation*

Authors: Mabel Natalia Correa Bermúdez and Fabián Humberto Sisa Ortiz**

Key Words: Reproduction, Sperm Kinematics, Lipid Peroxidation

Description:

Semen cryopreservation in sheep is an essential tool for genetic improvement and reproductive biotechnology; however, the freezing and thawing processes induce oxidative stress, membrane damage, and a reduction in seminal parameters. This study evaluated the effectiveness of adding antioxidants to the commercial extender Optixcell® on sperm quality in rams from Granja Los Andes, SENA CATA. Three adult males kept under semi-stabling conditions were used, and semen was collected using an artificial vagina. A seminal pool was prepared, and three treatments were established: T0 (Optixcell®), T1 (Optixcell® + Vitamin E at 2 mM), and T2 (Optixcell® + Reduced Glutathione at 5 mM). Samples were processed under standardized cryopreservation protocols and evaluated through macroscopic and microscopic analyses. The results showed that the addition of antioxidants had a positive effect on the preservation of sperm parameters compared to the control treatment. In particular, Vitamin E improved sperm kinematic parameters, especially VCL. These findings confirm that adding antioxidants to extenders can mitigate the effects of oxidative stress, optimizing semen quality after thawing. It is recommended to further standardize concentrations, validate and adjust cryopreservation protocols at each stage of the process, and expand the study with a larger number of animals and experimental replicates, in order to strengthen statistical evidence and enhance the reliability of the findings.

* Bachelor Thesis

**Institute of Regional Projection and Distance Education (IPRED), Program of Animal Science. Advisor: Daniel Felipe Torres Ruda, MSc, Zootechnician. Co-advisor: Nilson Ovidio Vargas Romero, Zootechnician.

Introducción

Los ovinos tienen un valor significativo como especie ya domesticada y se basa en sus altos rendimientos productivos como reproductivos, considerando que, además de adaptarse a ecosistemas que son poco aptos para algunas especies, permiten criar más animales por hectárea, disponen de un intervalo generacional corto, presentan una alta prolificidad, tienen un rápido crecimiento, presentan un óptimo aprovechamiento de nutrientes, además de ser eficaces controlando diferentes tipos de malezas y ofreciendo valor agregado a través de la obtención de productos procesados provenientes de la carne y la leche (Jahuey, citado en Cardona et al., 2020). Sin embargo, se requiere el uso de nuevas tecnologías que puedan optimizar el proceso.

En la actualidad un objetivo esencial para fortalecer la producción ganadera en Latinoamérica es reconocer y optimizar la genética de los animales que presentan indicadores de relevancia económica. Se destaca que una estrategia para incrementar la productividad de los hatos es usar métodos de biotecnología reproductiva, los cuales integran técnicas para el mejoramiento genético como lo señaló Jahuey (citado en Cardona et al., 2020), entre las cuales se destaca la inseminación artificial, la transferencia de embriones y la congelación de semen, sin embargo, existen fallas durante los procesos.

Los diluyentes comerciales usados actualmente para la criopreservación de semen de las distintas especies no previenen totalmente el daño celular y en los ovinos no es la excepción (Hurtado, 2024). Pues la problemática de mayor importancia consiste a que durante el proceso de dilución, enfriamiento y congelación ocurren cambios en la integridad de los espermatozoides (Margoth & La Cruz, 2022) reduciendo la viabilidad de los mismos y generando un menor éxito

en dichos procesos, reflejándose en las bajas tasas de fertilidad de las hembras inseminadas con semen descongelado en comparación con el semen fresco (Pizarro, 2023). Por eso, adicionar antioxidantes en los diluyentes para la criopreservación de material seminal ha mostrado una mejora notable en las características de los espermatozoides después de la descongelación, ya que evitan la degradación de los ácidos grasos polinsaturados y reducen el daño oxidativo.

Dentro de los reportes se encuentra que, la implementación de vitamina E y glutatión reducido (GSH), sobre el diluyente ha sido una alternativa prometedora, dado que estos antioxidantes protegen las membranas celulares de la peroxidación lipídica y neutralizan radicales libres (Inca, 2023). Según Córdova et al., (2017) el uso de glutatión reducido refleja un impacto favorable respecto a motilidad y espermatozoides vivos y un efecto positivo sobre la funcionalidad del acrosoma espermático, lo cual permite conservar la fertilidad del semen.

La mejora de los diluyentes para criopreservación puede generar un impacto positivo en los sistemas productivos de la región, dado que actualmente existen pocos estudios para la criopreservación de semen ovino. Por lo tanto, este estudio evaluó el efecto de la adición de antioxidantes (vitamina E y glutatión reducido, GSH), adicionados en el diluyente comercial Optixcell®, sobre los parámetros de cinemática espermática durante el proceso de criopreservación de semen ovino en la Granja Los Andes, SENA CATA.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la adición de antioxidantes (vitamina E y glutatión GSH) sobre parámetros de cinemática espermática durante el proceso de criopreservación de semen ovino en la Granja de los Andes, SENA CATA.

1.2 Objetivos Específicos

Determinar las características macroscópicas y microscópicas del semen ovino manejados en sistemas de estabulación durante el proceso de refrigeración.

Comparar la eficacia en el uso de vitamina E y glutatión en el diluyente comercial para congelación sobre las variables de calidad seminal en el método de congelación y descongelación del semen ovino.

2. Marco teórico

2.1 Macho ovino

El macho ovino conocido también como carnero desempeña un papel fundamental en la reproducción animal, ya que contribuye significativamente al mejoramiento animal y a la reproducción de los rebaños. Según Sánchez et al. (2020), el carnero representa el 50% de la contribución genética en la descendencia, lo cual resalta su importancia en los resultados de fertilidad. Una selección eficiente de machos, basada en evaluaciones tanto genéticas como reproductivas, puede llegar a optimizar los índices de fertilidad y la calidad de la progenie (Maquivar et al., 2021).

2.2 Pubertad

La pubertad en ovinos hace referencia al inicio de su capacidad reproductiva, este proceso se caracteriza por cambios hormonales, como el aumento de testosterona, la cual es considerada la hormona principal fundamental en la reproducción masculina, porque estimula el desarrollo de los órganos reproductivos, según (Shingange et al., 2023, p. 2). La fertilidad y la precocidad sexual son factores claves en la eficiencia económica, con un gran aumento en la producción de corderos anualmente (Chacón et al., 2018).

2.3 Desarrollo adulto

El desarrollo adulto de los ovinos depende en gran medida de aspectos genéticos, hormonales y ambientales, lo cual está debidamente influenciado por elementos que regulan el crecimiento, la maduración sexual y la función reproductiva, se identificaron genes asociados con rasgos de crecimiento muscular en ovinos, los cuales no solo impactan el desarrollo físico, sino

que participan en procesos celulares como la angiogénesis y la regulación del ciclo celular, contribuyendo así a la madurez física y reproductiva (Palacios et al., 2024).

2.4 Semen ovino

El semen de los ovinos está caracterizado por ser sensible al estrés térmico, el cual se da durante algunos procesos como la refrigeración y la congelación, dicha sensibilidad se atribuye a una elevada concentración de ácidos grasos en la membrana espermática, lo que lo hace más susceptible a la oxidación lipídica y puede tener un impacto negativo en su calidad y fertilidad (Torres et al., 2019).

2.4.1 Características del semen

El semen se divide en dos componentes principales: la primera parte contiene los gametos masculinos, representa aproximadamente el 26%, mientras que la segunda fracción, compuesta por el plasma seminal en estado líquido constituye el 74% e incluye diversas secreciones producidas por las glándulas accesorias como lo son la próstata y las vesículas seminales (Inca, 2023). Según estudios recientes se puede deducir que la motilidad espermática y la concentración de espermatozoides son mayores en regiones húmedas que en regiones secas y que la vagina artificial demostró ser más efectiva que la electroeyaculación, obteniendo mejores resultados en volumen, viabilidad, vigor y concentración espermática, dichos resultados indican que tanto las condiciones ambientales como el método de recolección son elementos clave que influyen en la calidad seminal en los ovinos (Carrascal et al., 2022).

2.4.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un ciclo biológico mediante el cual se generan células germinales masculinas haploides a partir de células madre espermatogoniales diploides en los túbulos

seminíferos. Inicialmente, las espermatogonias indiferenciadas se especializan y atraviesan múltiples divisiones mitóticas, lo que da origen a los espermatoцитos. Estas células luego ingresan a la meiosis, culminando en la formación de espermatozoides maduros, afirman (Su et al., 2023).

2.4.3 Composición del plasma seminal

El plasma seminal, que se origina en los testículos, el epidídimo y las glándulas accesorias, es un fluido liberado durante la eyaculación, representando aproximadamente 98 % del total del volumen eyaculado (Tirpák et al., 2021). Este líquido contiene una variedad de proteínas que cumplen con un papel primordial en la funcionalidad de los espermatozoides. Estas proteínas se adhieren a la superficie de los espermatozoides y modifican la estructura de los dominios proteicos en la membrana espermática, lo que influye en su capacidad para fecundar (Zueco, 2023).

2.5 Mecanismos de evaluación del semen

De acuerdo con Gallo, (2020), la evaluación del semen es un paso fundamental para entender la calidad del mismo y la capacidad reproductiva de los carneros. Para ello, existen varias formas de analizarlo, desde métodos sencillos que observan características a simple vista, hasta técnicas más modernas y precisas que utilizan tecnología computarizada. Cada método tiene sus pros y contras, pero cuando se combinan, permiten analizar de manera más completa y específica las características del semen.

2.5.1 Análisis macroscópico

Este tipo de análisis se desarrolla por medio de la observación de parámetros visuales, como el color, olor, volumen y la motilidad espermática, y sirven para identificar el potencial de fertilización del semen (Cobo, 2024). Volúmenes de eyaculado entre 1.13 y 2.19 ml, con promedios de 1.66 ml y 1.55 ml, son valores normales que reflejan la capacidad reproductiva, en efecto, estas observaciones indican la importancia de evaluar las características macroscópicas del

semen para seleccionar reproductores con alta calidad espermática, lo que contribuye a mejorar la eficiencia reproductiva en la cría de ovinos (Condori & Kantuta, 2021).

2.5.2 *Análisis microscópico*

Este análisis permite observar algunas características como la motilidad (movimiento de los espermatozoides), la viabilidad (porcentaje de espermatozoides vivos) y la integridad acrosomal (estado del acrosoma), estas evaluaciones se realizan en diferentes intervalos de tiempo, ayudan a identificar cambios en la calidad del semen bajo condiciones de refrigeración, proporcionando información detallada sobre su funcionalidad y eficacia reproductiva (Córdova et al., 2023).

2.5.3 *Análisis computarizado*

Los sistemas usados para el análisis computarizado, como el IVOS II®, permite una evaluación más precisa sobre la calidad espermática, evalúan los siguientes parámetros, motilidad total, motilidad progresiva, concentración espermática y viabilidad, eliminando la perspectiva relacionada con métodos tradicionales (Torres et al., 2019). Por otro lado, el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) también ofrece una evaluación objetiva y detallada (Jiménez et al., 2021). En los últimos años se ha implementado el uso de equipos computarizados de mano o que facilitan el uso en campo entre ellos el equipo ISperm®. En estudios realizados con iSperm® se han evidenciado correlaciones positivas en los resultados comparados con equipos CASA convencionales para parámetros como la motilidad total y progresiva, así como la concentración espermática, validándose como alternativa práctica para uso en campo, (Dini et al., 2019).

2.6 *Procesos de congelación*

El uso de semen congelado de ovino ha tenido un impacto significativo en la producción ganadera a nivel global, permitiendo una rápida transferencia de material genético de alta calidad

hacia poblaciones con características productivas menos favorables, por ende, facilita su distribución internacional. La congelación de semen de carnero requiere ajustes en todas las fases del proceso y así asegurar condiciones óptimas y maximizar los resultados, es decir, obtener la mayor cantidad de espermatozoides móviles y fértiles después de la descongelación, según (Hurtado, 2024).

2.6.1 Uso de diluyentes comerciales

Para mejorar las tasas de fertilidad, es esencial enfocarse en el tipo de diluyente y en el manejo adecuado del semen, ya que estos factores son cruciales para asegurar su viabilidad. Los diluyentes comerciales cumplen funciones clave, como preservar la estabilidad y función de la membrana plasmática, proporcionar nutrientes, actuar como amortiguadores, mantener el equilibrio electrolítico, regular la presión osmótica y proteger las células durante la congelación. Estas características contribuyen a obtener semen diluido con altos índices de eficacia (Hurtado, 2024). Entre los diluyentes comerciales más utilizados, como Triladyl, Ovixcell y Andromed, se ha demostrado que Triladyl es el más efectivo para preservar la calidad espermática. Este diluyente protege la membrana plasmática y controla la presión osmótica durante el proceso de congelación, lo que lo convierte en una opción preferencial para la criopreservación (Paucar et al., 2025).

2.6.2 Enriquecimiento de diluyentes

La adición de los diluyentes mediante el uso de sustancias de conservación, innovadoras y convencionales puede afectar las características de los espermatozoides y la fertilidad (Mohamed et al., 2020). El enriquecimiento de diluyentes con diferentes antioxidantes como son, la quercetina y la vitamina E mejoran la calidad del semen luego de la descongelación, según (Jiménez et al., 2021).

2.6.2.1 Productos naturales. Estudios previos han demostrado que productos naturales pueden ser incorporados como aditivos en el semen para mejorar su calidad. Algunos de estos productos naturales incluyen el extracto de nopal (Enrique, 2022) y el extracto de ajo (Gerardo, 2024). Además, la quercetina, un flavonoide antioxidante presente en diversos vegetales, ha sido utilizada como aditivo en diluyentes de criopreservación (Jiménez et al., 2021). Estos compuestos naturales han demostrado mejorar la calidad del semen ovino; no obstante, su efectividad depende de las concentraciones utilizadas, las cuales influyen directamente en la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides.

2.6.2.2 Productos Químicos. En la criopreservación del semen ovino, se utilizan productos químicos como lo es el glicerol, que actúa como crioprotector, impidiendo la formación de hielo “cristales” durante la congelación, lo que reduce el daño celular y optimiza la capacidad de supervivencia de los espermatozoides posteriormente (Rubio et al., 2021)

2.7 Tipos de estrés durante la congelación

El proceso de enfriamiento del semen genera efectos perjudiciales sobre las propiedades de los espermatozoides (Mohamed et al., 2020). Debido a que varios factores, como la temperatura, la concentración durante el almacenamiento y el tipo de diluyente empleado, pueden afectar significativamente a integridad y la capacidad de supervivencia de los espermatozoides en el transcurso de la preservación del semen (Rizkallah et al., 2022). Durante dicho proceso, los espermatozoides están expuestos a diferentes tipos de estrés, como el térmico, osmótico y oxidativo (Paucar et al. 2025). El estrés oxidativo es generado por la formación de especies reactivas de oxígeno, esta clase de estrés es un desafío que se manifiesta durante la criopreservación de semen, porque puede dañar la membrana espermática y reducir la viabilidad de los espermatozoides (Jiménez et al., 2021).

3. Metodología

3.1 Área de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el sistema de producción ovino y caprino del “SENA CATA”, ver Figura 1, ubicado en la vereda Calichal del municipio de Málaga, Santander, en las coordenadas 6°43'26" N y 72°43'05" W, dentro de la provincia de García Rovira, a una altitud de 2.152 m s. n. m. y con una temperatura promedio que varió entre 12 y 25 °C, durante un periodo de seis meses. Los diferentes procesos, como la evaluación, dilución y almacenamiento del semen, también fueron ejecutados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Centro Agroempresarial y Turístico de los Andes (LBRSA).

Figura 1

Ubicación Granja los Andes, SENA.



Nota. Tomado de google earth (Walter Piracoca) Foto - nov 2020.

3.2 Unidades experimentales

Para desarrollar la investigación se utilizaron tres machos mestizos que se encontraban en una madurez sexual adecuada, con edades entre 2 y 5 años, y presentaban un estado corporal de 3,5 – 4 (escala de 1 a 5). Los animales fueron mantenidos en condiciones de semiestabulación y su alimentación estuvo basada en pasto King Grass Morado (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*), 200 g día⁻¹ de concentrado comercial, sal mineralizada y agua ad libitum. Cabe resaltar que se implementó un periodo de acostumbramiento de dos semanas, durante el cual los machos se familiarizaron con la vagina artificial, el entorno y el procedimiento de colecta, lo que permitió obtener muestras de semen de alta calidad.

3.3 Colección de semen

Los machos fueron evaluados fenotípicamente asegurando que estuvieran en buenas condiciones de salud, se desinfectó el prepucio con solución salina al 0.9 eliminando restos de orina o cualquier otro contaminante, el pene fue expuesto y se verificó que no presentara lesiones que pudieran afectar la muestra del eyaculado; se colectaron por medio de vagina artificial, la cual estaba previamente preparada (desinfectada, lubricada, atemperada), posteriormente, se utilizó una hembra como maniquí y se colocó la vagina artificial para que el macho eyaculara (ver Apéndice A). Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a baño maría a 37,5 °C. Una vez colectados los eyaculados, se seleccionaron aquellos que se encontraban en óptimas condiciones para conformar un pool homogéneo de semen.

3.4 Evaluación del semen

Se evaluaron las características macroscópicas del semen: volumen (\pm ml), color (blanco opalescente, cremoso o amarillento), pH (rango normal entre 6,5 y 7,5) y consistencia (fluido,

moderadamente viscoso o muy viscoso). Asimismo, se analizaron las variables microscópicas de motilidad (%), viabilidad (%), morfología (%), concentración de espermatozoides (ml) y anomalías espermáticas (%).

3.5 Preparación de la dilución del semen

En este estudio se utilizó el diluyente comercial Optixcell® como base para la preparación de los tratamientos experimentales. A partir de este medio, se incorporaron los antioxidantes seleccionados con el fin de evaluar su efecto durante el proceso de crio preservación. Para la preparación de cada tratamiento se utilizó una mezcla compuesta por 60% de agua bidestilada y 40% de diluyente puro, lo que permitió garantizar la homogeneidad de las soluciones y mantener condiciones adecuadas para la manipulación y posterior evaluación del semen. Se trabajaron dos adiciones específicas: la primera correspondió a la vitamina E, en una concentración de 2 mM (8 μ L) y disuelta directamente en el diluyente; la segunda consistió en glutatión reducido (GSH), en una concentración de 5 mM (13,6 μ L).

Se establecieron tres tratamientos experimentales: Tratamiento control (T0: Optixcell® sin adición), Tratamiento 1 (T1: Optixcell® + Vitamina E a 2 mM) y Tratamiento 2 (T2: Optixcell® + Glutatión reducido a 5 mM). Durante la preparación de cada mezcla se homogeneizó en un agitador magnético a 300 rpm durante 3 minutos, con el fin de asegurar la incorporación uniforme de todos los componentes, (ver Apéndice B).

3.5.1 Proceso de dilución

El semen fresco recolectado se diluyó para obtener pajillas de 0,5 ml, agregando 13,3 μ L de semen puro en cada tratamiento hasta alcanzar una concentración de 60×10^9 EZp. La dilución se realizó gradualmente, añadiendo el diluyente en pequeñas alícuotas y mezclando suavemente para evitar el estrés osmótico en los espermatozoides. Después de la dilución, las muestras se

mantuvieron a 37 °C durante 10 minutos para permitir la estabilización de los espermatozoides antes de iniciar el proceso de enfriamiento.

3.5.2 Criopreservación

El proceso de criopreservación se realizó siguiendo protocolos estandarizados para garantizar la viabilidad y calidad espermática post-descongelación (Hurtado, 2024; Paucar et al., 2025). Las muestras de semen diluidas se envasaron en pajillas de 0,5 ml utilizando una pipeta estéril. Después del llenado, el extremo opuesto de la pajilla se selló con alcohol polivinílico para evitar fugas durante la congelación. Se realizó una curva de refrigeración a una tasa de enfriamiento de 1°C cada 5 min. Las pajillas se mantuvieron a 4 °C durante 2 horas antes de la congelación durante un proceso de estabilización. Posteriormente, las pajillas se colocaron sobre vapores de nitrógeno líquido a una altura de 4 cm durante 10 minutos y luego se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -196 °C para su almacenamiento en termos criogénicos hasta su uso en los procesos de descongelación y evaluación, (ver Apéndice B). El resto del semen se manejó en condiciones de refrigeración y fue evaluado hasta las 22 horas.

3.6 Análisis estadísticos de los resultados

Cada tratamiento tuvo 10 réplicas para un total de 30 pajillas congeladas para su evaluación. Una vez terminado el proceso, se analizaron las variables de cinemática espermática: motilidad (%), motilidad progresiva (%), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio de trayectoria (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), rectitud (STR, %) y linealidad (LIN, %), morfología (%). Los datos obtenidos se analizaron mediante un diseño completamente al azar de una vía y 3 niveles de clasificación. Se aplicó una prueba de Tukey para determinar diferencias entre medias y se trabajó con un nivel de confianza del 95 %. Todos los datos fueron analizados con el programa SAS University®.

4. Resultados y discusión

Determinar las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco de ovinos, manejados en sistemas de estabulación durante el proceso de refrigeración.

Para empezar el proceso de verificación de calidad de semen se realizó la evaluación macroscópica del semen obtenido. Se determinó el color, la motilidad masal y motilidad individual progresiva previo a la dilución en los tratamientos. Se encontró que el semen presentaba coloración blanca y el volumen obtenido del pool de eyaculados fue igual a $3,5\pm 0,1$ ml, y un pH de 6,5. El semen presentaba una consistencia cremosa. En la figura 2, se ve el eyaculado inicial.

Figura 2

Eyaculado inicial.



Nota. Eyaculado fresco de ovino, con características macroscópicas normales: color blanco, consistencia cremosa y pH de 6,5.

La viabilidad espermática se determinó mediante la tinción eosina-nigrosina. Los espermatozoides que se observan teñidos de rojo o rosado corresponden a células muertas, mientras que aquellos que permanecen incoloros o transparentes se consideran viables. Se evidenció que el 76% de los espermatozoides fueron viables, mientras que el 24% restante correspondió a células no viables, caracterizadas por la tinción de su membrana plasmática. En la (Figura 3) se pueden observar los espermatozoides viables y no viables.

Figura 3

Viabilidad espermática.



Nota. Se observan espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina a un objetivo de 1000X.

La evaluación morfológica de la muestra evidenció que el 87% de los espermatozoides correspondieron a estructuras normales, mientras que el 13% presentó anomalías. Entre las alteraciones primarias se identificaron espermatozoides con cabeza piriforme (figura 4), lo cual es considerado una anomalía que puede afectar la capacidad fecundante según Perry (2021), y dentro de las secundarias se observaron piezas intermedias dobladas, ver (Figura 5) o engrosadas (Figura 6), presencia de gota citoplasmática residual (Figura 7), así como colas enrolladas (Figura 8) y

fracturadas (Figura 9) lo cual está asociado al proceso de maduración espermáticas y/o fallas en el proceso de manipulación del semen (Agarwal et al., 2022).

Figura 4

Espermatozoide ovino con cabeza piriforme.



Nota. Espermatozoide ovino con alteración morfológica en la cabeza de tipo piriforme vista a 1000x.

Figura 5

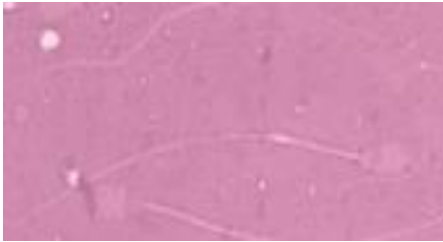
Espermatozoide ovino con pieza intermedia doblada.



Nota. Espermatozoide ovino que presenta un defecto en la pieza intermedia doblada vista a 1000x.

Figura 6

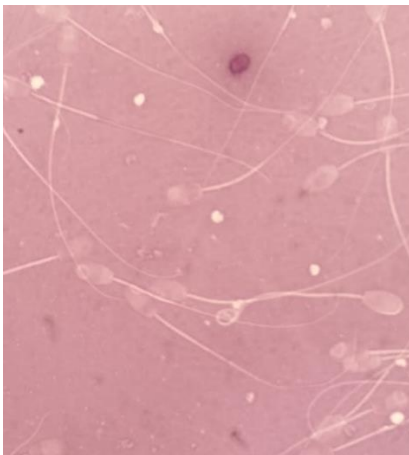
Espermatozoide ovino con pieza intermedia engrosada.



Nota. Espermatozoide ovino con alteración morfológica en la pieza intermedia engrosada vista a 1000x.

Figura 7

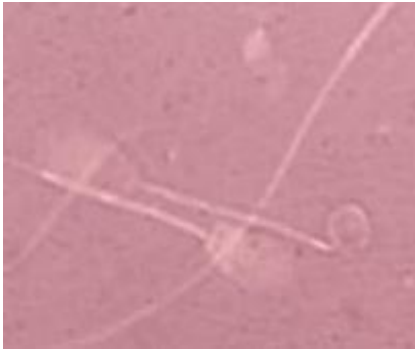
Espermatozoide ovino con gota citoplasmática residual.



Nota. Espermatozoides ovinos con presencia de gota citoplasmática residual vista a 1000x.

Figura 8

Espermatozoide ovino con cola enrollada.



Nota. Espermatozoide ovino con cola enrollada vista a 1000x.

Figura 9

Espermatozoide ovino con cola fracturada.



Nota. Espermatozoide ovino con cola fracturada vista a 1000x.

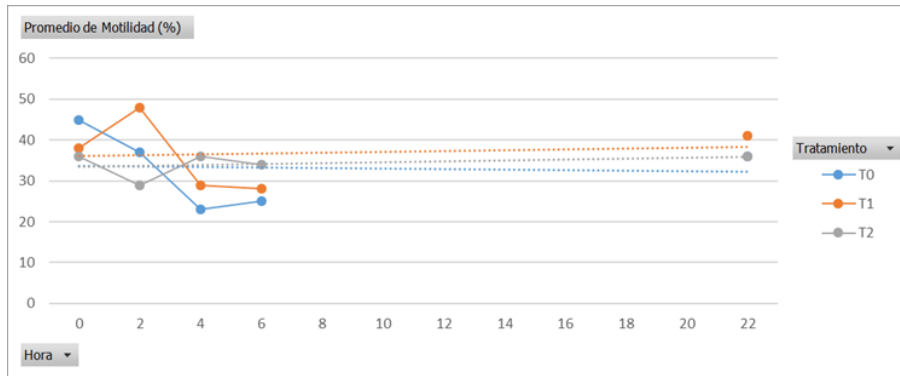
Posteriormente, se efectuaron las diluciones correspondientes a los tres tratamientos experimentales y se procedió a la medición de las variables de cinemática espermática, evaluando: motilidad (%), motilidad progresiva (%), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio de trayectoria (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), rectitud (STR, %) y linealidad (LIN, %). Las muestras fueron sometidas a un proceso de enfriamiento controlado, disminuyendo la temperatura a razón de 1 °C cada 5 minutos hasta alcanzar los 5 °C. Una vez refrigeradas, las

variables fueron registradas cada dos horas (0, 2, 4 y 6 horas), y nuevamente a las 22 horas. En las Gráficas 1–7 se presentan los resultados obtenidos.

En el análisis de la motilidad del semen refrigerado, se observa en la Gráfica 1 una motilidad más elevada y variable en los tres grupos, destacándose T1 con un pico cercano al 50%, lo que sugiere un efecto inicial positivo de la vitamina E sobre la estabilidad de la motilidad. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, todos los tratamientos presentan una disminución marcada de la motilidad hasta estabilizarse en valores entre 30 y 40%, siendo T0 el que mantiene los porcentajes más bajos y T1 el que logra conservar cifras ligeramente superiores al final del periodo de evaluación. T2, por su parte, muestra un comportamiento intermedio, sin llegar a superar de manera consistente al grupo con vitamina E. Estos resultados indican que el uso de antioxidantes contribuye a una mejor preservación de la motilidad espermática durante la refrigeración, especialmente la vitamina E, que parece conferir una mayor protección frente al deterioro oxidativo en comparación con el glutatión. A diferencia de Jiménez et al., (2021), quienes no encontraron un efecto favorable de la adición de vitamina E como antioxidante en las variables de motilidad evaluadas. Estos efectos contradictorios de la adición de vitamina E pueden deberse a diferentes componentes de los diluyentes.

Gráfica 1

Motilidad

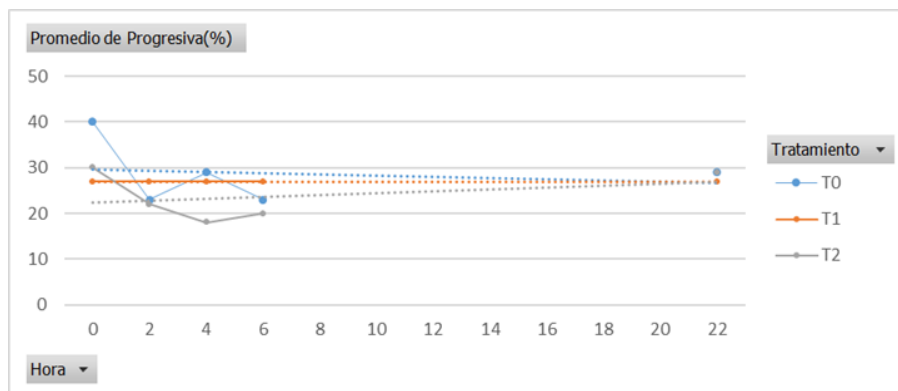


Nota. Comportamiento de la motilidad espermática del semen ovino en tres tratamientos durante la refrigeración y hasta las 22 horas posteriores a la colecta.

El análisis de la motilidad progresiva del semen ovino refrigerado, se observa en la Gráfica 2 donde el tratamiento control (T0, sin antioxidante) inicia con el valor más alto cercano al 40%, pero presenta una caída brusca en las primeras horas, estabilizándose luego alrededor del 28–30%, lo que refleja una pérdida rápida de vitalidad inicial, aunque con mantenimiento aceptable a mediano plazo. Por su parte, el tratamiento con vitamina E (T1) inicia con valores más bajos (~28–30%), pero destaca por su mayor estabilidad a lo largo del tiempo, evidenciando un efecto protector que disminuye la variabilidad en la motilidad progresiva. En contraste, el tratamiento con GSH (T2) muestra los valores más bajos y una tendencia descendente marcada en las primeras horas, lo que indica menor eficacia en condiciones de refrigeración. Los resultados sugieren que la vitamina E ofrece un efecto antioxidante más consistente en la preservación de la motilidad progresiva bajo condiciones de almacenamiento en frío. Según reportes de Martínez et al. (2011), una vez la movilidad espermática inicia, su duración es corta, asociada a la hipotonicidad del medio de activación, que puede generar eventualmente daño celular.

Gráfica 2

Motilidad Progresiva

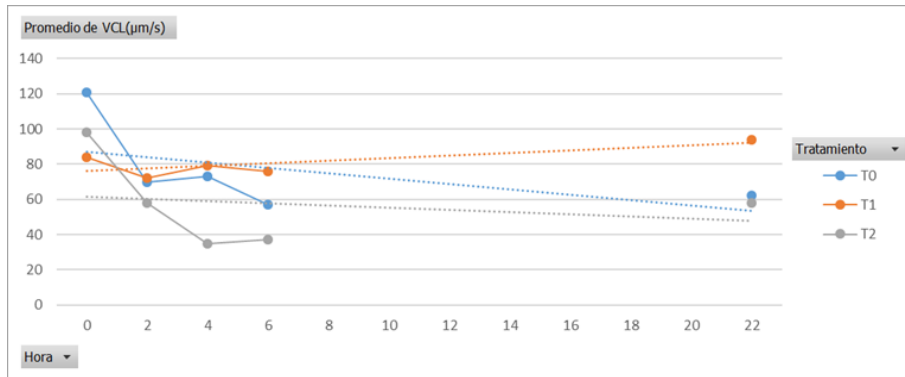


Nota. Registro de la motilidad progresiva del semen ovino en tres tratamientos durante el periodo de refrigeración de 22 horas.

La velocidad curvilínea (VCL) en semen ovino refrigerado, Gráfica 3, evidencia un marcado descenso inicial en todos los tratamientos, siendo más pronunciado en T2, que cae rápidamente por debajo de $40 \mu\text{m/s}$ en las primeras horas, lo que refleja una pérdida acelerada de la energía cinética de los espermatozoides bajo este antioxidante. T0 inicia con valores altos cercanos a $120 \mu\text{m/s}$, pero presenta una disminución progresiva y constante a lo largo del tiempo, estabilizándose alrededor de $60 \mu\text{m/s}$ en las últimas horas. En contraste, T1 muestra un comportamiento más estable, con una caída menos drástica y una tendencia ascendente hacia las 22 horas, superando a los demás tratamientos con valores cercanos a $90 \mu\text{m/s}$, lo que indica que este antioxidante favorece la preservación de la motilidad espermática en términos de velocidad de desplazamiento. Se evidencia que la vitamina E aporta un efecto protector más consistente sobre la VCL durante la refrigeración, mientras que el glutatión no ofrece beneficios claros y, por el contrario, podría acelerar la pérdida de velocidad espermática.

Gráfica 3

Velocidad curvilínea VCL



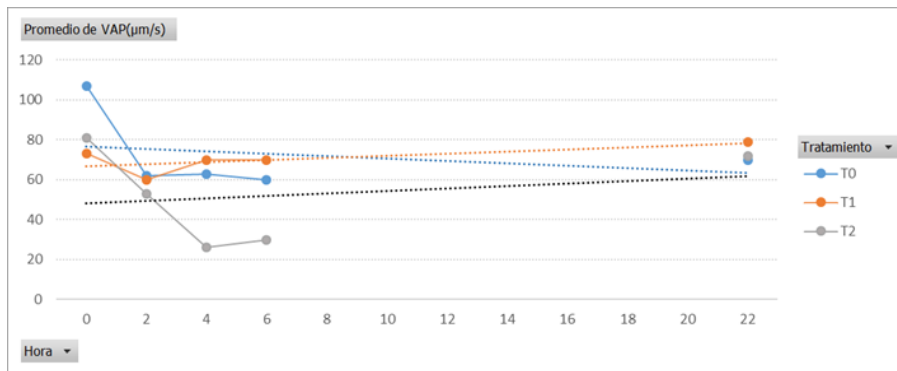
Nota. Análisis de la velocidad curvilínea la cual está expresada en micrómetros por segundo ($\mu\text{m/s}$).

La velocidad promedio de trayectoria (VAP), Grafica 4, en semen ovino refrigerado, muestra que, aunque todos los tratamientos experimentan un descenso inicial, existen diferencias marcadas en su comportamiento a lo largo del tiempo. T0 (sin antioxidante) inicia con el valor más alto cercano a 110 $\mu\text{m/s}$, pero desciende bruscamente en las primeras horas para luego estabilizarse alrededor de 65–70 $\mu\text{m/s}$ hacia el final del periodo. T1 (vitamina E) presenta valores más estables desde el inicio, manteniéndose en un rango de 65–80 $\mu\text{m/s}$ y mostrando un ligero incremento hacia las 22 horas, lo que refleja un efecto positivo en la preservación de la capacidad cinética de los espermatozoides. En contraste, T2 (glutación) exhibe la caída más marcada, con valores que bajan rápidamente por debajo de 30 $\mu\text{m/s}$ en las primeras horas y que solo muestran una leve recuperación hacia el final, permaneciendo como el tratamiento con peor desempeño. Estos resultados afirman que la vitamina E contribuye de manera más efectiva a conservar la VAP en condiciones de refrigeración, mientras que el glutación no protege adecuadamente este parámetro

de motilidad. Resultados similares han sido descritos por Riesco et al. (2021), quienes incluyeron la VAP dentro de los parámetros cinemáticos evaluados en semen ovino criopreservado y reportaron que la adición de antioxidantes favoreció la preservación de la cinética espermática. Esto confirma que la VAP es un indicador sensible del estado funcional del espermatozoide y que su mantenimiento depende de la capacidad del antioxidante para reducir el daño oxidativo asociado a los procesos de almacenamiento. De esta manera, los hallazgos sugieren que la vitamina E ejerce un efecto protector más consistente sobre la trayectoria promedio del espermatozoide, en comparación con el glutatión, que no logra contrarrestar de forma eficaz la pérdida de movimiento coordinado.

Gráfica 4

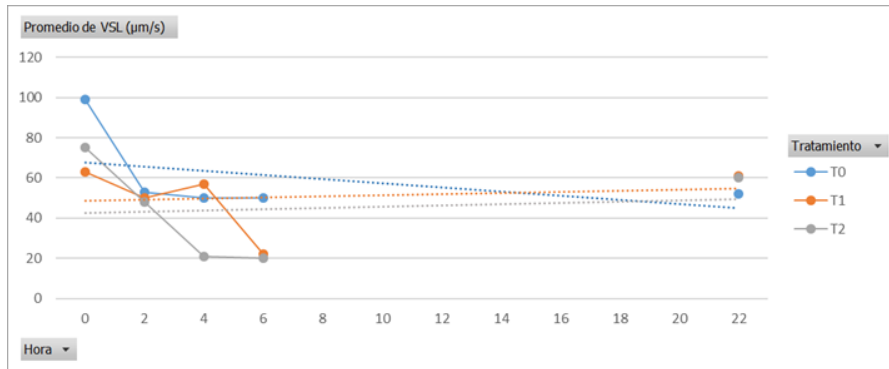
Velocidad promedio de trayectoria VAP



Nota. Análisis de la velocidad promedio de trayectoria la cual está expresada en micrómetros por segundo ($\mu\text{m/s}$).

En la Gráfica 5, de velocidad rectilínea (VSL) en semen ovino refrigerado evidencia un marcado descenso en las primeras horas de evaluación en todos los tratamientos, siendo más pronunciado en T1 (vitamina E) y T2 (glutatión), que caen rápidamente hasta valores cercanos a

20 $\mu\text{m/s}$, lo que refleja una pérdida acelerada de la capacidad de desplazamiento lineal de los espermatozoides. En contraste, T0 (sin antioxidante) inicia con la VSL más elevada, superior a 100 $\mu\text{m/s}$, y aunque presenta una disminución progresiva, logra estabilizarse en torno a 50–55 $\mu\text{m/s}$ al final del periodo, superando a los grupos con antioxidantes. Hacia las 22 horas, T1 muestra cierta recuperación, alcanzando valores similares a T0, mientras que T2 permanece más bajo, con un desempeño limitado. Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo observado en otras variables de motilidad, la adición de antioxidantes no ejerció un efecto protector claro sobre la VSL, siendo incluso el grupo control el que mantuvo una trayectoria más estable en el tiempo. De manera semejante, Carriço et al. (2021) reportaron que la adición de 5 mM de glutatión en semen ovino diluido y criopreservado afectó negativamente parámetros cinemáticos como VSL, VAP, LIN y STR. Esto podría deberse a que concentraciones inadecuadas de antioxidantes alteran el equilibrio redox, comprometen la función mitocondrial o afectan la integridad de la membrana y del axonema, reduciendo la producción de ATP necesaria para mantener el movimiento lineal de los espermatozoides. Por otro lado, el buen desempeño del grupo control (T0) podría explicarse porque, en ausencia de antioxidantes externos, el semen mantiene su estado redox natural, evitando posibles desequilibrios prooxidantes que algunos antioxidantes pueden inducir cuando se utilizan a concentraciones no óptimas.

Gráfica 5*Velocidad rectilínea VSL*

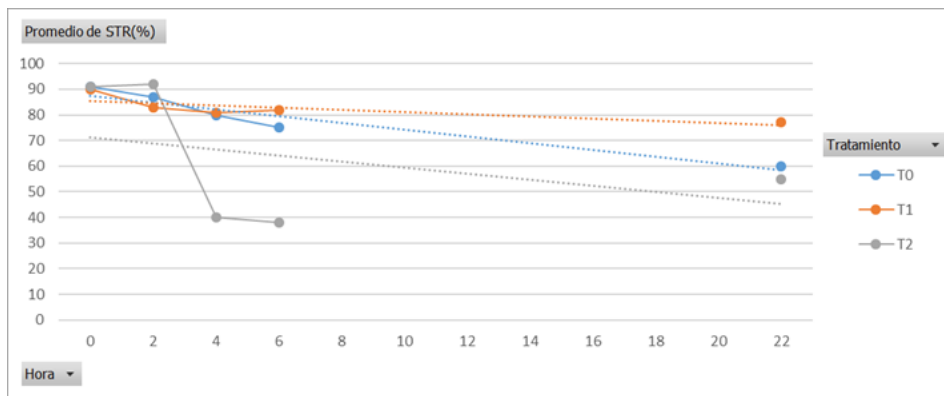
Nota. Análisis de la velocidad rectilínea la cual está expresada en micrómetros por segundo ($\mu\text{m/s}$).

En la Gráfica 6, la rectitud (STR) en semen ovino refrigerado muestra que, aunque todos los tratamientos inician con valores altos cercanos al 90%, sus tendencias difieren claramente a lo largo del tiempo. T1 (vitamina E) mantiene la mayor estabilidad, con una disminución gradual que se estabiliza en torno al 75–80%, lo que indica un mejor efecto protector sobre la direccionalidad del movimiento espermático. T0 (sin antioxidante) parte con valores similares, pero evidencia una caída progresiva más marcada, alcanzando cerca del 60% hacia las 22 horas, reflejando una pérdida más acelerada de la capacidad de desplazamiento rectilíneo. En contraste, T2 (glutatión) presenta la disminución más drástica, descendiendo rápidamente por debajo del 40% en las primeras horas y permaneciendo bajo a lo largo de la evaluación, lo que sugiere un efecto poco favorable de este antioxidante sobre la rectitud. En conjunto, los resultados señalan que la vitamina E ofrece la mayor protección para mantener la STR durante la refrigeración, mientras que el glutatión no evita el deterioro temprano de este parámetro de motilidad. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Riesco et al. (2021), quienes incluyeron la rectitud espermática ($\text{STR} > 80\%$) como criterio fundamental para clasificar la motilidad progresiva en semen ovino y observaron que el uso de

antioxidantes favoreció el mantenimiento de trayectorias rectas y progresivas tras la descongelación. En este sentido, la estabilidad de la rectitud resulta crucial para garantizar un desplazamiento eficiente de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación, lo que refuerza la importancia del uso de antioxidantes como la vitamina E en la preservación de parámetros cinemáticos asociados con la calidad reproductiva.

Gráfica 6

Rectitud SRT



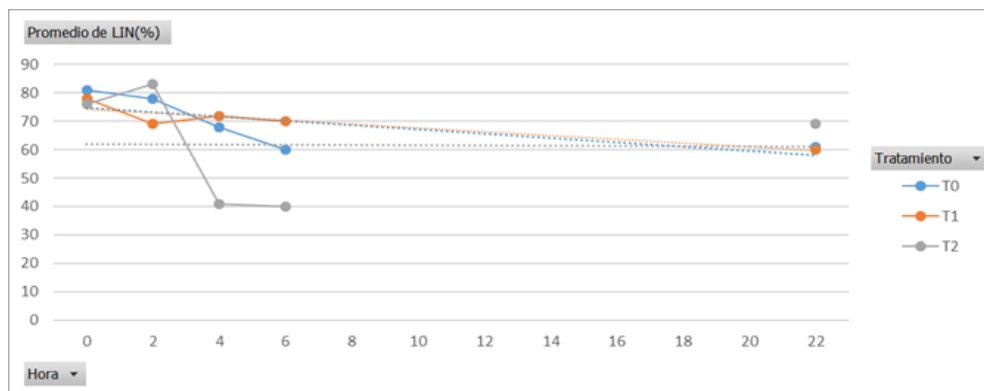
Nota. Comportamiento de la rectitud espermática expresada en porcentaje (%) durante 22 horas posteriores a la colecta.

En la Gráfica 7, la linealidad (LIN) en semen ovino refrigerado muestra que los tres tratamientos parten con valores altos, cercanos al 80–85%, aunque rápidamente se observa un descenso diferenciado en cada grupo. T0 (sin antioxidante) presenta una caída moderada, estabilizándose alrededor del 65% hacia las 22 horas. T1 (vitamina E) mantiene un comportamiento similar, con una reducción paulatina y sin cambios abruptos, terminando también cerca del 65%, lo que evidencia un efecto estable de este antioxidante para preservar la trayectoria lineal de los espermatozoides. En contraste, T2 (glutatión) experimenta una disminución drástica

en las primeras horas, descendiendo hasta cerca del 40%, aunque al final del periodo se observa una recuperación parcial que lo ubica nuevamente en valores comparables a los otros tratamientos. En conjunto, los resultados sugieren que la vitamina E contribuye a sostener la estabilidad de la linealidad en la motilidad espermática, mientras que el glutatión presenta un efecto más variable, con un deterioro temprano y una posterior recuperación que no le permite superar consistentemente a los demás grupos.

Gráfica 7

Linealidad LIN



Nota. Comportamiento de la linealidad espermática expresada en porcentaje (%) durante 22 horas posteriores a la colecta.

La cinemática espermática no presentó gran diferencia entre los tratamientos control frente a los enriquecidos con antioxidantes, evidenciando una alta viabilidad para el uso de semen

refrigerado hasta 22 horas después de colectado, sin necesidad de asumir costos en el manejo de los diluyentes.

Comparar la eficacia en el uso de vitamina E y glutatión en el diluyente comercial para congelación sobre las variables de calidad seminal en el método de congelación y descongelación del semen ovino.

El proceso de congelación de semen se desarrolló con el diluyente OptiXcell®. En carneros, este diluyente a base de liposomas ha demostrado mantener la integridad de la membrana y la viabilidad espermática en comparación con los diluyentes tradicionales elaborados con yema de huevo (Luna-Orozco et al., 2019). Una vez terminado el proceso de congelación las pajillas fueron descongeladas según el protocolo (ver Apéndice #) y se evaluaron las variables de cinemática espermática con el equipo ISperm® con una sub muestra de 7,5µl.

Las concentraciones utilizadas para las diluciones fueron definidas acorde a estudios anteriores. Según estudios como los de Jiménez et al. (2021) y Torres-Ruda et al. (2019), la concentración óptima de vitamina E en diluyentes para criopreservación de semen ovino es de 2–5 mM. Así mismo, Glutatión reducido (GSH): De acuerdo con Córdova et al. (2017) y Trejo Córdova et al. (2017), el glutatión reducido ha mostrado efectos positivos en la motilidad y viabilidad espermática en concentraciones de 5–10 mM.

En la Tabla 1, se presentan los resultados de las variables de cinemática espermática del semen posdescongelación, donde solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la variable Velocidad rectilínea ($p < 0,05$).

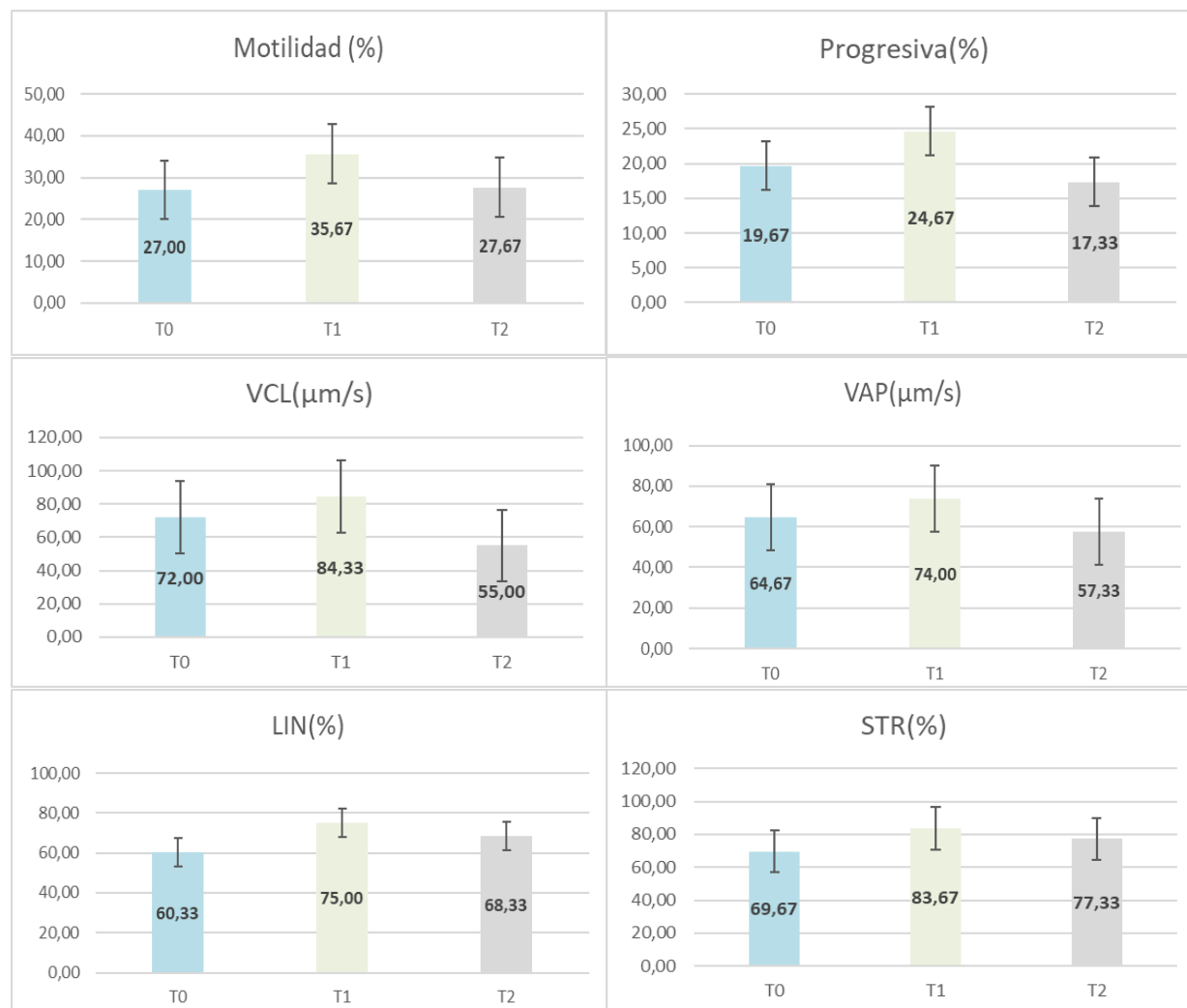
Tabla 1

Variables de cinemática espermática

Tratamiento	Motilidad Progresiva (%)	Progresiva (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	STR (%)	LIN (%)
T0	27,0 \pm 7,0	19,66 \pm 3,51	72,0 \pm 21,63	64,66 \pm 16,25	52,0 \pm 9,0 ^{ab}	69,66 \pm 12,74	60,33 \pm 7,02
T1	35,66 \pm 9,07	24,66 \pm 0,57	84,33 \pm 12,01	74,0 \pm 10,14	60,66 \pm 6,42 ^b	83,66 \pm 11,01	75,0 \pm 9,53
T2	27,66 \pm 6,35	17,33 \pm 4,04	55 \pm 9,84	57,33 \pm 8,50	39,0 \pm 6,24 ^a	77,33 \pm 6,80	68,33 \pm 10,11

Nota: Los resultados se presentan como la media (media \pm EE). ^{ab} Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Como no se presentaron diferencias significativas en el comportamiento de varias variables de la cinemática espermática, se graficaron para determinar los mínimos y máximos obtenidos en cada una. En la Gráfica 8, se evidencia el comportamiento de dichas variables.

Gráfica 8*Variables de cinemática espermática.*

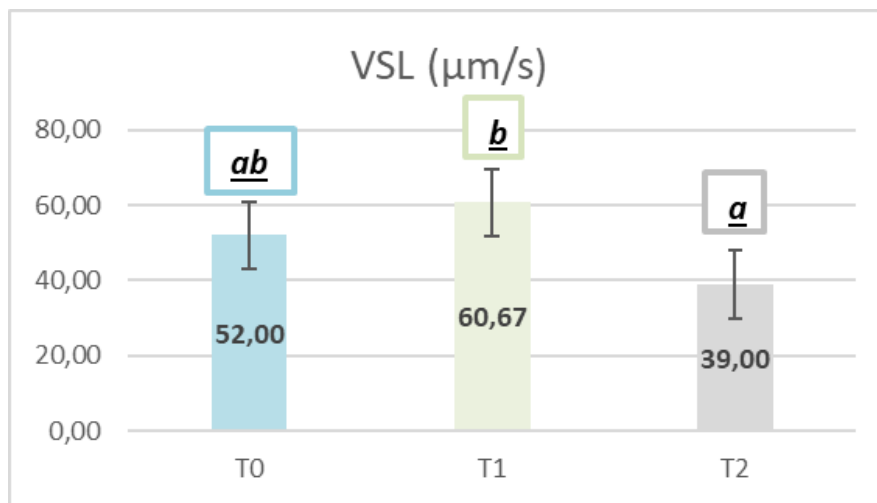
Nota. Comparación de los valores promedio de VCL, VAP, VSL, STR y LIN entre los tratamientos: T0 (control), T1 (vitamina E) y T2 (glutación) evaluados con el ISperm a un objetivo de 200X.

Para la única variable que presento diferencias estadísticamente significativas fue la Velocidad Rectilínea (VSL), como se muestra en la Gráfica 9, porque el tratamiento con vitamina

E (T1) presentó el mayor valor promedio de VSL (60,67 $\mu\text{m/s}$), siendo estadísticamente superior al tratamiento con glutatión (T2), que mostró el valor más bajo (39,00 $\mu\text{m/s}$). El grupo control (T0) registró un valor intermedio (52,00 $\mu\text{m/s}$), sin diferencias significativas frente a T1, pero sí respecto a T2.

Gráfica 9

Velocidad rectilínea VSL



Nota. La velocidad rectilínea presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), indicando un efecto diferencial de los antioxidantes sobre el desplazamiento lineal de los espermatozoides.

5. Conclusiones y recomendaciones

Se comprobó que el semen de ovinos manejados en sistemas de estabulación puede conservar su viabilidad hasta por 22 horas bajo condiciones de refrigeración, siempre y cuando se cumpla con una adecuada calidad inicial del semen fresco. Este hallazgo resulta relevante para los programas de reproducción asistida, ya que amplía el margen de tiempo disponible para el uso de las dosis seminales refrigeradas en procesos como la inseminación artificial. De esta manera, se resalta la importancia de realizar una correcta evaluación del eyaculado antes de su procesamiento, ya que la calidad inicial constituye un factor determinante en la preservación y longevidad de los espermatozoides.

El uso de vitamina E y glutatión en el diluyente comercial para congelación no mostró efectos estadísticamente significativos sobre la mayoría de los parámetros de calidad seminal ni sobre las variables de cinemática espermática, con excepción de la velocidad rectilínea (VSL), en la cual sí se evidenció una diferencia. Este resultado sugiere que, aunque los antioxidantes evaluados poseen un potencial teórico para contrarrestar el daño oxidativo generado durante el proceso de criopreservación, en las condiciones de este estudio su efecto no fue lo suficientemente marcado para mejorar la calidad espermática de manera global. Esto indica la necesidad de seguir explorando concentraciones, combinaciones y condiciones de uso que permitan optimizar su acción protectora.

Se recomienda profundizar en la estandarización de las concentraciones de antioxidantes y en la validación de protocolos de criopreservación en cada una de sus etapas, con el fin de minimizar el estrés oxidativo y mejorar la eficiencia de conservación del semen ovino. Asimismo, es indispensable ampliar el número de animales evaluados y las repeticiones experimentales, lo cual fortalecerá la solidez estadística de los resultados y aumentará la confiabilidad de los hallazgos. De igual forma, futuros estudios podrían considerar la inclusión de otros antioxidantes o combinaciones de los mismos, así como la evaluación de su efecto a diferentes tiempos de almacenamiento, lo que contribuiría a generar información más completa y aplicable a los sistemas de producción ovina y a los programas de reproducción asistida.

Referencias bibliográficas

- Agarwal, A., Sharma, R., Gupta, S., Finelli, R., Parekh, N., Panner Selvam, M. K., Henkel, R., Durairajanayagam, D., Pompeu, C., Madani, S., Belo, A., Singh, N., Covarrubias, S., Darbandi, S., Sadeghi, R., Darbandi, M., Vogiatzi, P., Boitrelle, F., Simopoulou, M., ... Shah, R. (2021). Sperm Morphology Assessment in the Era of Intracytoplasmic Sperm Injection: Reliable Results Require Focus on Standardization, Quality Control, and Training. *The World Journal of Men's Health*, 40(3), 347–360. <https://doi.org/10.5534/wjmh.210054>
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., & Ullah, N. (2023). Antioxidant supplementation in semen extenders improves post-thaw quality of spermatozoa. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43831-2>
- Avdatek, F., et al. (2024). Cryopreservation of ram semen: Baicalein efficiency. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1394273. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1394273>
- Berean, D. I., et al. (2024). Advances in antioxidant supplementation for semen cryopreservation. *Antioxidants*, 13(6), 624. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11201015/>
- Cardona Tobar, K. M., López Álvarez, D. C., & Álvarez Franco, L. Á. (2020). Genomic association studies in Latin American sheep. *Mexican Journal of Animal Sciences*, 11(3), 859–883. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5372>
- Carrascal-Triana, E. L., Moya Romero, D. C., Herrera Perez, N., & Cañas Álvarez, J. J. (2022). Seminal characteristics of sheep under environmental conditions of the Colombian Caribbean. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(4), e21611. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i4.21611>

- Cariço, C., Barbas, J. P., Pimenta, J., & Simões, J. (2021). Efecto de la adición in vitro de melatonina y glutatión sobre los parámetros seminales de carneros en semen diluido y después de la descongelación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24, 1–15.
- Chacón, L., Lozano Márquez, H., Orozco Clavijo, J. A., & Ardila Silva, A. (2018). Puberty characteristics in hairy lambs and their crosses in Colombia under low-altitude conditions. *MVZ Córdoba Journal*, 24(1), 7097–7103. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.1227>
- Condori, R., & Kantuta, E. (2021). Evaluación de la calidad espermática de semen fresco en carneros Targhee y Corredale. *Apthapi*, 7(2), 2190–2192. http://revistasbolivianas.umsa.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2519-93822021000200009
- Córdova Izquierdo, A., Villa Mancera, A. E., Gómez Vázquez, A., Bedolla Cedeño, C., Olivares Pérez, J., Sánchez Aparicio, P., Juárez Mosqueda, M. de L., & Sánchez Sánchez, R. (2023). Efecto del diluyente sobre la calidad del espermatozoide de semen ovino refrigerado. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 31(Suplemento), 5–7. <https://doi.org/10.53588/alpa.310502>
- Gallo Silva, J. (2020). Implementación del triple test espermático en semen ovino refrigerado en el trópico bajo [Tesis de pregrado]. Universidad Francisco de Paula Santander. <http://repositorio.ufps.edu.co/handle/ufps/4372>
- Gerardo López, D. (2024). Efecto del extracto de ajo, tiempo de refrigeración y diluyentes comerciales en bacterias aisladas a partir de semen caprino [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Sinaloa. http://repositorio.uas.edu.mx/jspui/handle/DGB_UAS/793
- Hurtado Espinoza, W. (2024). Effect of three types of diluents on the viability and sperm motility in frozen semen of sheep from the tropics in Madre de Dios. <http://hdl.handle.net/20.500.14070/1199>

- Inca Pilco, D. M. (2023). Efecto del plasma seminal y vitamina E sobre el proceso de criopreservación y calidad post descongelado de semen ovino [Trabajo de titulación]. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/39868>
- Jiménez-Aguilar, E., Quezada-Casasola, A., Prieto-Caraveo, M., Orozco-Lucero, E., Itzá-Ortiz, M., & Carrera-Chávez, J. (2021). Evaluation of the addition of quercetin and vitamin E to the cryopreservation medium of ovine semen on in vivo fertility. *Veterinary Fan*, 11, e126. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.36>
- López, R., et al. (2022). Desarrollo sexual en carneros mestizos: Implicaciones reproductivas. *Revista Iberoamericana de Producción Animal*, 23(1), 12–20. <https://revistaveterinaria.net/index.php/ripa/article/view/220>
- Luna-Orozco, J. R., González-Ramos, M. A., Calderón-Leyva, G., Gaytán-alemán, L. R., Arellano-Rodríguez, F., Ángel-García, O., & Véliz-Deras, F. G. (2019). Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(2), 126–130. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2019.5262>
- Maquivar, M., Smith, S. M., & Busboom, J. R. (2021). Reproductive management of rams and ram lambs during the pre-breeding season in US sheep farms. *Animals*, 11(9), 2503. <https://doi.org/10.3390/ani11092503>
- Margoth, S. C. E., & La Cruz Tandazo, F. J. D. (2022, septiembre 29). Eficacia de tres protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos con diferentes velocidades de enfriamiento sobre la calidad espermática post descongelación. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/40020>
- Martínez, G., Atencio, V., & Pardo, S. (2011). Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2554–2563.

- Mohamed, M. Y., Mahdy, T. M., & Khalifa, E. I. (2020). The possibility of using citric phosphate dextrose in chilling ram semen instead of egg yolk and soybean lecithin to improve fertility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(5), 1313–1322. <https://doi.org/10.1111/jpn.13389>
- Mujitaba, M. A., et al. (2024). Advances in semen extenders for ruminants. *Veterinary Sciences*, 11(3), 69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11047534/>
- Palacios Erazo, Y. A., Ariza Botero, M. F., Bustamante Yáñez, M. J., Vergara Garay, Ó. D., & Álvarez Franco, L. Á. (2024). Estudio de asociación de todo el genoma sobre rasgos de crecimiento en ovejas de pelo colombianas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 77(1), 10625–10635. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v77n1.105408>
- Paucar-Quito, J. E., Moscoso-Piedra, A. L., Alvarado-Alvarado, J. C., & Maldonado-Cornejo, M. E. (2025). Evaluación de tres dilutores comerciales sobre el semen de ovino post-congelación. *Polo del Conocimiento*, 10(1), 2542–2566. <https://doi.org/10.23857/pc.v10i1.8829>
- Pereira das Neves Snoeck, L., et al. (2023). Characterization of ram semen and fertility indicators. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 10127573. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10127573/>
- Perry V. E. A. (2021). The Role of Sperm Morphology Standards in the Laboratory Assessment of Bull Fertility in Australia. *Frontiers in veterinary science*, 8, 672058. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.672058>
- Pizarro Baculima, M. A. (2023). Evaluación de tres diluyentes comerciales para la crioconservación de semen de carnero de la raza Dorper [Tesis de pregrado]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/26553>
- Riesco, M. F., Anel-López, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Montes-Garrido, R., Alvarez, M., de Paz, P., & Anel, L. (2021). Multiparametric study of antioxidant effect on ram sperm

cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1187.

<https://doi.org/10.3390/ijms22031187>

Rizkallah, N., Chambers, C. G., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2022). Factors affecting the survival of ram spermatozoa during liquid storage and options for improvement. *Animals*, 12(3), 244.

<https://doi.org/10.3390/ani12030244>

Rubio-Guillén, J., Díaz-Sánchez, A., Osorio-Meléndez, C., González-Villalobos, D., & Quintero-Moreno, A. (2021). Crioprocesado de semen ovino: efecto sobre el patrón de motilidad y la distribución de subpoblaciones espermáticas. *Journal of Veterinary Andrology*, 6(1), 19–39.

Sánchez Gómez, A., Avilés Diadosa, S., Rueda Torres, J. M., Arrebola Molina, F. A., Querino Santiago, F. J., Muñoz, F. B., Castillejo Lacalle, E., & Abecia Martínez, J. A. (2020). Evaluación reproductiva de carneros en rebaños ovinos. *Ganadería*, 126, 32–35.

<https://www.researchgate.net/publication/341120970>

Shingange, R., Ramukhithi, F. V., & Maqhashu, A. (2023). The use of hormonal assay, phenotypic morphometry, and CASA semen analysis to estimate attainment of puberty in indigenous ram lambs. In *Landraces: Its productive conservation in animals and plants*. IntechOpen.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.106234>

Spanner, E. A., et al. (2024). Post-thaw sperm quality as predictor of fertility in ruminants. *Scientific Reports*, 14, 79253. <https://www.nature.com/articles/s41598-024-79253-x>

Su, J., Yang, Y., Zhao, F., Zhang, Y., Su, H., Wang, D., Song, Y., & Cao, G. (2023). Study of spermatogenic and Sertoli cells in the Hu sheep testes at different developmental stages. *The FASEB Journal*, 37(8), e23084. <https://doi.org/10.1096/fj.202300373R>

Tirpák, F., Halo, M., Jr., Tokárová, K., Binkowski, L. J., Vašíček, J., Svoradová, A., Błaszczyk-Altman, M., Kováčik, A., Tvrdá, E., Chrenek, P., Lukáč, N., & Massányi, P. (2021). Composition of

stallion seminal plasma and its impact on oxidative stress markers and spermatozoa quality. *Life*, 11(11), 1238. <https://doi.org/10.3390/life11111238>

Torres-Ruda, F., Manjarrez, C. I., Carvajal-Serna, M., & Grajales-Lombana, 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. <https://doi.org/10.19052/mv.vol11.iss38.9>

Trejo Córdova, A., Ramírez Ordóñez, S., Meza-Villalvazo, V. M., & Abad Benítez, I. (2017). Adición del glutatión reducido al diluyente de semen de borrego durante la conservación (5 °C). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 25(3–4), 177–182. <https://www.researchgate.net/publication/319433889>

Wu, C., et al. (2021). Effect of thawing rates and antioxidants on semen cryopreservation in Hu sheep. *Biopreservation and Biobanking*, 19(3), 204–209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33625896/>

Zhu, Z., et al. (2023). Resveratrol improves frozen-thawed ram sperm via reducing oxidative stress. *Antioxidants*, 12(1), 115. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10740518/>

Zueco, Á., Directoras, T., Gascón, A., & Pérez, R. (n.d.). Efecto del plasma seminal durante los procesos de capacitación espermática ovina durante la estación reproductiva y no reproductiva [Trabajo de grado]. Universidad de Zaragoza. <https://zaguan.unizar.es/record/149509/files/TAZ-TFG-2024-3438.pdf?version=1>

Apéndices

Apéndice A: Protocolo de trabajo de campo para recolección de semen ovino.

Objetivo:

Obtener eyaculados de buena calidad para su posterior procesamiento y evaluación, garantizando el bienestar animal y la precisión en la toma de muestras.

Materiales necesarios:

- Vagina artificial
- Termo con agua caliente (40-45 °C)
- Guantes desechables
- Lubricante estéril
- Conos de colectas
- Tubos de ensayo
- Solución salina al 0.9 %
- Jeringas
- Papel absorbente
- Cinta de sujeción o lazo
- Termómetro

Procedimiento:

1. Preparación de la vagina artificial:

- Llenar con agua caliente (40-45 °C) hasta alcanzar la temperatura adecuada interna (38 40 °C).
- Lubricar el interior con lubricante estéril.
- Colocar el cono de recolección y conectar un tubo de ensayo limpio y seco.

2. Revisión y acondicionamiento del macho:**2.1 Evaluar estado físico general:**

- Condición corporal (CC): Escala del 1 al 5. Ideal para colecta: entre 3 y 3.5 (ni flaco ni excesivamente gordo).
- Se palpa la región lumbar (costillas y lomo).

2.2 Estado de salud general:

- Ojos: brillantes, sin secreciones.
- Nariz y boca: sin mucosidades, llagas ni mal olor.
- Orejas: móviles, sin lesiones ni costras.
- Temperatura corporal: entre 38.5 °C y 39.5 °C.
- Frecuencia respiratoria y cardíaca dentro de rangos normales.

2.3 Estructura y aplomos:

- El animal debe caminar bien, sin cojeras.
- Pezuñas limpias y sin infecciones (como pododermatitis).

2.4 Sistema reproductor externo:

Prepucio y pene: sin inflamaciones, heridas o secreciones anormales, este se debe desinfecta con una jeringa que contenga solución salina.

Testículos:

- Deben ser simétricos y firmes al tacto, no dolorosos.
- Tamaño acorde a la edad y raza.
- Se palpa el cordón espermático para verificar que no haya nódulos o sensibilidad.

2.5 Comportamiento:

- Animal alerta, con buena respuesta a estímulos.
- Muestra interés cuando se le presenta una hembra en celo.

3. Recolección del semen:

- Posicionar adecuadamente el macho frente a la hembra.
- En el momento del salto del macho introducir el pene en la vagina artificial y permitir la eyaculación.
- Inmediatamente transferir el eyaculado al baño María a 37.5 °C para estabilizar.

4. Registro de datos:

- Registrar fecha, hora, código del animal y observaciones.
- Transporte al laboratorio:
- Mantener las muestras en baño María o termo con temperatura controlada hasta su procesamiento.

Apéndice B: Protocolo de laboratorio para la evaluación del efecto de antioxidantes (Vitamina E y GSH) en la criopreservación de semen ovino.

Objetivo:

Establecer el procedimiento estandarizado para la preparación de diluyentes con antioxidantes, la dilución, congelación y evaluación post-descongelación de semen ovino, con el fin de determinar el efecto de la Vitamina E y el Glutatió reducido sobre su calidad espermática.

EPPS:

- Bata de laboratorio
- Tapabocas
- Guantes desechables y estériles

Materiales:

- Tubos Falcon de 15 ml
- Agua destilada
- Optixcell (diluyente comercial)
- Vitamina E
- Glutatió reducido (GSH)
- Micropipeta (ajustable de 100–1000 μ l y 10–100 μ l)
- Puntas para micropipeta – estériles
- Vaso de precipitados o soporte para tubos

- Marcador permanente – para rotular tubos
- Alcohol polivinílico – para sellado de pajillas
- Tiras de PH
- Pajillas de 0.5 ml
- Laminas y laminillas
- Tubos Eppendorf
- Sellador de pajillas
- Microscopio óptico
- iSperm®

Preparación del diluyente y tratamientos experimentales

➤ **Preparación del diluyente base: 2:1 (20 mL de agua destilada: 10 mL de OptiXcell®).**

- Precalentar (atemperar) a **37 °C** el agua bidestilada, el OptiXcell® y las soluciones de antioxidantes (vitamina E y glutatión reducido – GSH).

- En una probeta de 50 mL medir 20 mL de agua bidestilada y 10 mL de OptiXcell®.

Posteriormente, en tubos ámbar adicionar una cápsula de cada antioxidante.

- Homogeneizar la mezcla en un agitador magnético a 300 rpm durante 3 minutos, garantizando la incorporación uniforme de los componentes.

- Atemperar el diluyente y los antioxidantes en baño maría a 37 °C.

➤ **Distribución en tratamientos experimentales (volumen final: 10 mL cada uno):**

• **Tratamiento control (T0):**

En un tubo Falcon estéril, mezclar el volumen correspondiente de agua destilada y OptiXcell® (sin antioxidantes) hasta completar 10 mL.

• **Tratamiento 1 (T1 – Vitamina E):**

En un tubo Falcon, adicionar agua destilada, OptiXcell® y **8 µL de vitamina E**, ajustando el volumen final a 10 mL.

• **Tratamiento 2 (T2 – Glutación reducido, GSH):**

En un tubo Falcon, adicionar agua destilada, OptiXcell® y **13.6 µL de glutación reducido (GSH)**, ajustando el volumen final a 10 mL.

Dilución e inoculación del semen

- A cada tratamiento (T0, T1 y T2) se le adicionan **13.3 µL de semen puro**.
- La incorporación debe hacerse **lentamente**, mezclando de forma suave para evitar daños mecánicos en los espermatozoides.
- Posteriormente, mantener la mezcla a **37 °C durante 10 minutos** para permitir la estabilización del semen en el diluyente.

1. Evaluación inicial del semen: (características)

Macroscópicas:

volumen (ml): se mide directamente utilizando tubos graduados o pipetas automáticas. El volumen del eyaculado puede variar dependiendo del animal, pero generalmente se encuentra entre 0.5 y 1.5 ml.

Color: Se observa a simple vista. El color normal del semen ovino es blanco opalescente o cremoso. Un color amarillento puede indicar presencia de orina, y tonalidades rojizas pueden sugerir contaminación con sangre.

pH: se determina usando tiras reactivas de pH o un pH-metro digital. El rango fisiológico ideal para semen ovino está entre 6.5 y 7.5. Valores fuera de este rango pueden indicar alteraciones en el ambiente seminal.

Consistencia: se evalúa visualmente o inclinando el tubo que contiene el semen. Puede ser fluida, moderadamente viscosa o muy viscosa. La viscosidad influye en la capacidad de los espermatozoides para moverse adecuadamente.

Microscópicas: (iSperm®)

Motilidad espermática total y progresiva: el iSperm® analiza el movimiento de los espermatozoides en campo microscópico, clasificando la motilidad como progresiva (movimiento hacia adelante en línea recta), no progresiva (movimiento en círculos o errático) e inmóvil. El sistema proporciona el porcentaje de cada categoría.

Concentración espermática: el software calcula la concentración de espermatozoides en millones por mililitro, a partir de una dilución estandarizada y el área de observación definida por el sistema.

2. Envasado:

- Llenar pajillas de 0.5 ml con semen diluido.
- Sellar con alcohol polivinílico.

3. Congelación:

- Las pajillas se mantendrán a 4 °C durante 2 horas para permitir la estabilización de los espermatozoides antes de la congelación.
- Exposición en vapores de nitrógeno líquido (4 cm sobre la superficie) por 10 minutos.
- Inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C) para almacenamiento.

4. Descongelación y análisis posterior:

- Descongelar 3 pajillas de cada tratamiento a 37 °C durante 30 segundos.
- Transferir el contenido de cada pajilla a un tubo ámbar. Posteriormente, pipetear 7.5 µL de la muestra y depositarlos en el iSperm para su análisis.