



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA  
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA  
MENAQUINONA 4 EN SEMEN OVINO POST  
CONGELACIÓN**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

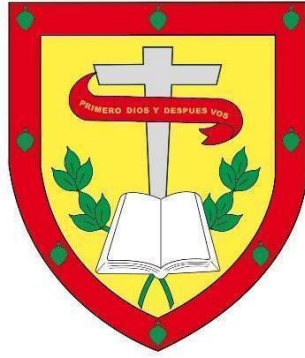
**AUTOR: JUAN CARLOS ZUÑA LEÓN**

**DIRECTOR: DR. ANDRES LEONARDO MOSCOSO PIEDRA  
MSC.**

**CUENCA -ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA  
MENAQUINONA 4 EN SEMEN OVINO POST  
CONGELACIÓN**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

**AUTOR: JUAN CARLOS ZUÑA LEÓN**

**DIRECTOR: DR. ANDRES LEONARDO MOSCOSO PIEDRA MSC.**

**CUENCA -ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Juan Carlos Zuña León**, portador de la cédula de ciudadanía N.º **0104789599**. Declaro ser el autor de la obra: **“Efecto de la concentración de la Menaquinona 4 en semen ovino post congelación”** sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaró finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **23 de septiembre de 2024**



F: .....

**Juan Carlos Zuña León**

CI. **0104789599**

## CERTIFICACIÓN

Yo, **ANDRES LEONARDO MOSCOSO PIEDRA**, certifico que el presente trabajo, “**EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA MENAQUINONA 4 EN SEMEN OVINO POST CONGELACIÓN**” fue desarrollado por **JUAN CARLOS ZUÑA LEÓN**, y ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad Católica de Cuenca.

Debido que es una investigación particular con el propósito de cumplir un requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario

Cuenca, agosto de 2024

**ANDRES  
LEONARDO  
MOSCOSO  
PIEDRA**

Firmado  
digitalmente por  
ANDRES  
LEONARDO  
MOSCOSO PIEDRA

Fecha: 2024.09.05  
17:08:17 -05'00'

---

Dr. **ANDRES LEONARDO MOSCOSO  
PIEDRA  
TUTOR**

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE CUENCA**

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa tan importante en mi vida, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de este camino.

En primer lugar, a mi madre, Elva Zuña, por su amor incondicional, su fortaleza y por ser mi pilar fundamental en los momentos más difíciles. Gracias por tus sacrificios, tu sabiduría y por siempre creer en mí, incluso cuando las circunstancias se tornaron complicadas. Sin ti, este logro no habría sido posible.

A Isabel Zuña, por su compañía y apoyo inquebrantable. Tus palabras de aliento y tu presencia constante me dieron el impulso necesario para seguir adelante.

A mis amigos, quienes han sido mi red de soporte en los momentos de alegría y en los de incertidumbre. Su confianza y amistad me han motivado a seguir persiguiendo mis metas.

Finalmente, a todas las personas que de una manera u otra han contribuido a este logro. Su apoyo, en cualquier forma que haya llegado, fue crucial para que hoy pudiera alcanzar esta meta.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá Elva Zuña, gracias por darme la vida y por tu apoyo incondicional. Tus palabras de aliento y tu amor me han sostenido a lo largo de este arduo camino. No tengo suficiente gratitud para expresar lo mucho que significas para mí y lo fundamental que ha sido tu presencia en mi vida.

A Isabel Zuña, mi segunda mamá, gracias por criarme y guiarme con tanto amor y sabiduría. Tus enseñanzas y tu ejemplo han sido mi faro en los momentos de duda. Gracias por estar siempre ahí, por tus consejos y por tu paciencia infinita.

A ambas, por ser pilares fundamentales en mi vida y por creer en mí incluso cuando yo dudaba, les dedico con todo mi amor y gratitud este logro.

**Juan Carlos Zuña León**

## ÍNDICE

<b>Declaratoria de Autoría y Responsabilidad</b> .....	III
<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	IV
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	V
<b>DEDICATORIA</b> .....	VI
<b>Resumen</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	10
<b>Materiales y Métodos</b> .....	14
<i>Criopreservación del semen</i> .....	15
<i>Descongelación del semen</i> .....	15
<i>Integridad de la membrana post descongelamiento</i> .....	16
<i>Vitalidad post descongelamiento</i> .....	16
<i>Análisis de la funcionalidad mitocondrial</i> .....	17
<i>Análisis Estadístico</i> .....	18
<i>Diseño Experimental</i> .....	18
<b>Resultados</b> .....	18
<b>Discusión</b> .....	22
<b>Conclusiones</b> .....	25
<b>Bibliografía</b> .....	27
<b>SOLICITUD DE EMBARGO TEMPORAL DE OBRA</b> .....	30

**Resumen**

La producción de ovinos en los países andinos representa una actividad económica importante por lo cual se ha incrementado la necesidad de mejorar su reproducción siendo la inseminación artificial (IA) y de manera específica la técnica de crioconservación las más estudiadas. Para mantener y mejorar la calidad seminal en diferentes especies se han adicionado antioxidantes de origen sintético y natural para incrementar la fertilidad mejorando la calidad del semen. Con estos antecedentes se estudió el papel de la Menaquinona-4 (vitamina K2) adicionada al semen de ovinos, principalmente por su propiedad antioxidante para que permita mejorar las características del semen en su proceso de congelación y post congelación. En esta investigación se evaluó el efecto de la concentración de esta en semen ovino post-congelación, aplicado en las siguientes dosis (1milíMol y 10 milíMol), en semen diluido de ovinos de las razas Dorper, Katahdin y Pelibuey, en un lapso de 11 días se estudió semen libre de tratamiento. Los resultados demostraron que la aplicación de Menaquinona-4 aplicada al semen fresco mostró mejores características sobre las muestras descongeladas en valores del yoduro de propidio, progresivos, no progresivos, inmóviles, velocidad curvilínea, velocidad media, lineal, amplitud de la cabeza y batida de cola. A partir del sistema C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Analysis System) los valores se redujeron significativamente ( $p < 0,01$ ). Se concluye que el tratamiento con el uso de la Vitamina K sobre semen ovino reduce el daño celular al neutralizar los radicales libres dando como resultado espermatozoides más activos y funcionales después de la congelación.

**Palabras clave:** Inseminación artificial, calidad espermática, crioconservación, Menaquinona 4.

**Abstract**

The production of sheep in the Andean countries represents an important economic activity, which has increased the need to improve their reproduction, with artificial insemination (AI) and specifically the cryopreservation technique being the most studied. To maintain and enhance seminal quality in different species, synthetic and natural antioxidants have been added to increase fertility by improving semen quality. With this background, the role of Menaquinone-4 (vitamin K2) added to sheep semen was studied, mainly for its antioxidant property to improve the characteristics of the semen during the freezing and post-freezing processes. In this research, the effect of the concentration of this substance in post-thaw ovine semen was evaluated, and applied in the following doses (1 millimole and 10 millimoles), in diluted semen from Dorper, Katahdin, and Pelibuey sheep. Over 11 days, semen free of treatment was studied. The results demonstrated that the application of Menaquinone-4 to fresh semen showed better characteristics in thawed samples regarding propidium iodide values, progressive motility, non-progressive motility, immobile sperm, curvilinear velocity, average velocity, linearity, head amplitude, and tail beat. Based on the C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Analysis System), the values were significantly reduced ( $p < 0.01$ ). It is concluded that treatment with Vitamin K on ram semen reduces cellular damage by neutralizing free radicals, resulting in more active and functional sperm after freezing.

**Keywords:** Artificial insemination, sperm quality, cryopreservation, Menaquinone 4.

## **Introducción**

Los ovinos son pequeños mamíferos rumiantes que pueden adaptarse a cualquier tipo de clima, en los países andinos esta especie es criada para obtener una serie de beneficios entre los cuales está la alimentación pues la carne es de alta calidad proteica, la leche es la materia prima para la elaboración del queso, y su lana forma parte importante en la industria textil, así mismo su estiércol, es utilizado como abono orgánico (Sáenz Garcia, 2015).

Razón por la cual la producción de ovinos se ha convertido en una actividad pecuaria de gran importancia por lo cual es necesario satisfacer la demanda creciente sobre todo de carne para el consumo humano principalmente por sus cualidades nutricionales, a la par han incrementado las alternativas para su reproducción (Feijó, 2018). Según información proporcionada por el Instituto Nacional de Estadística y Censos del Ecuador (INEC), en el año 2020 la cría de ovejas representa una actividad importante en la economía rural principalmente en la Sierra, aportando significativamente a la economía local, por la comercialización de carne y producción de lana en el sector agropecuario.

Los ovinos forman parte importante en la economía pecuaria en los países andinos, lo que incrementa la necesidad de potenciar su reproducción, sin embargo, los agricultores que desean incorporarse al plano comercial se enfrentan a dificultades en lo que requiere el manejo de tecnologías genéticas modernas, mientras que los pequeños agricultores continúan en las prácticas tradicionales destinadas a la subsistencia (Marle et al., 2018).

Para potenciar la reproducción de ovinos están las técnicas de inseminación artificial (IA), la producción de embriones in vivo e in vitro (IVEP), la ovulación múltiple, la transferencia de embriones (MOET), producción de embriones in vitro (IVEP) y la criopreservación de semen y embriones (Mahoete, 2010) Un aspecto indispensable en la IA es el análisis de la producción de espermatozoides, normalmente el semen es de color blanco opaco de textura viscosa se compone de: espermatozoides, agua, fructuosa, proteínas, enzimas y minerales como calcio, potasio y zinc, su volumen puede variar de 1.5 y 5 mililitros, de igual forma su viscosidad puede modificarse en cada eyaculación pues esto facilitará su movilidad, su pH ligeramente alcalino favorece la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino (Valverde et al., 2018).

Si bien es cierto la criopreservación de semen es la técnica de reproducción asistida más utilizada, se conoce que el enfriamiento, congelación y descongelación puede ocasionar

daños en los espermatozoides lo que podría afectar su capacidad fecundante (Bester, 2008). El autor Mahoete (2010) menciona que en el proceso de congelación y descongelación los espermatozoides pueden presentar anomalías morfológicas principalmente puede darse una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por lo cual hay un mayor daño a los espermatozoides siendo este un factor determinante para la infertilidad.

Los espermatozoides poseen membranas con una alta concentración de lípidos poliinsaturados, por lo cual son mayormente sensibles a las ROS y daño oxidativo, así también la peroxidación lipídica puede provocar la pérdida de la fluidez e integridad de la membrana, por lo cual provoca un incremento de la permeabilidad, manifestándose en una movilidad reducida, morfología anormal daño del ADN, así también la muerte de los espermatozoides (Agarwal y Sharma, 2014).

En los procesos de congelación y descongelación es importante la reducción de efectos adversos en los que respecta a la hipertonidad extensora y cristalización de hielo, peroxidación, en el proceso de criopreservación se produce estrés oxidativo que alteran la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Seadawy et al., 2022). Al momento no existe una metodología estandarizada para cada etapa del procedimiento de criopreservación, sin embargo, se está estudiando la adición de antioxidantes, enzimas y sustancias no enzimáticas para mejorar los resultados del proceso (Yáñez et al., 2022).

De acuerdo con el estudio de Fernández et al. (2006) se encontró que en la IA en ovinos el uso de semen refrigerado es recomendado para periodos cortos de conservación (8-12h) en comparación con el uso de semen refrigerado, largos (12-24 h), por tanto, es importante tomar en cuenta que los espermatozoides conservados presentan cambios funcionales y estructurales en sus membranas las cuales van a determinar una vida media más corta.

La criopreservación del semen responde a un proceso que da inicio con la preparación y dilución de los espermatozoides hasta continuar con el mantenimiento de las capacidad funcional de los espermatozoides, pues requieren mantener sus atributos funcionales para ser fértiles, es así que se ha probado con diversos productos químicos principalmente están los crioprotectores siendo el más común el glicerol, sin embargo se ha limitado su uso debido a su toxicidad a la vez va a depender de las velocidades de enfriamiento y la composición del diluyente (Neves et al., 2014).

Los espermatozoides son altamente sensibles a las bajas temperaturas cuando atraviesan un proceso de congelación, esto se debe principalmente a las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática cuando existe la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) esta sustancia, incide directamente en la reacción del acromosoma y la estabilización de la cápsula mitocondrial para la pieza intermedia (Allai et al., 2018). Los efectos de la congelación y descongelación en los espermatozoides son cambios en los lípidos de sus membranas que se traduce en pérdida de su integridad, movimiento, actividad de ATPasa de membrana, lo que trae como consecuencia una baja supervivencia (Parkinson y Morell, 2018).

Es importante indagar sobre alternativas que permitan un mejor resultado de inseminación artificial con semen congelado en ovinos pues al momento este procedimiento es nuevo por tanto se requiere indagar sobre su efectividad, pues un proceso de congelamiento suele ocasionar daños ocasionados a la membrana espermática, sin embargo, la adición de agentes crioprotectores apropiados como glicerol y el etilenglicol, la sacarosa y la trehalosa se podría preservar la motilidad espermática en ovinos (Ruiz et al.,2007).

Existen alternativas para preservar la calidad del esperma como es la adición de la yema de huevo liofilizada, la yema de huevo plasmática y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) han mostrado resultados satisfactorios principalmente porque proporcionan efectos crioprotectores, pues la LDL favorece la estabilización de la membrana de los espermatozoides, protegiéndola de la peroxidación lipídica y aumentando la actividad de los antioxidantes enzimáticos (Neves et al.,2014).

Es importante mencionar que el semen del ovino tiene un alto contenido de Fosfolipasa A, esta enzima reacciona con la adición de la yema de huevo (YH) y con la leche descremada (LD), por tanto estos elementos actúan como protectores de la membrana en el proceso de congelación, a pesar de existir diferentes métodos para reducir el efecto de la Fosfolipasa A del semen ovino; el procedimiento tradicional ha sido la remoción del plasma seminal a través del lavado mediante centrifugación, sin embargo, a la par se dan las pérdidas proteínas, azúcares y lípidos, lo que reduciría las funciones de los espermatozoides (Umar et al.,2018).

El uso de Albúmina Sérica (BSA) es un componente diluyo-conservador, por su perfil de aminoácidos y funciones protectoras, mismas que mejora los resultados de motilidad y viabilidad espermática, así como también brinda una mayor integridad a la membrana,

por tanto, tiene un efecto protector en el proceso de congelación y descongelación (Martínez et al., 2022).

La adición de vitaminas en la inseminación artificial de ovinos ha demostrado efectos positivos, por ejemplo, la vitamina A, es conocida por sus beneficios en el desarrollo, crecimiento diferenciación celular y de manera específica en la reproducción animal probada en las técnicas de reproducción artificial principalmente porque sus metabolitos afectan el crecimiento folicular ovárico, la esteroidogénesis además el BC aporta en el mejoramiento de la maduración citoplasmática por sus propiedades antioxidantes que no pueden ser reemplazadas por el AR (Ikeda et al., 2005).

La vitamina K<sub>2</sub> tiene la función principal de coagulación, función ósea y cardiovascular por lo cual permite mantener la salud del cuerpo incluyendo la prevención del cáncer de hígado, pulmón y páncreas, principalmente, por su papel regulador en el metabolismo de la glucosa y el calcio, la promoción del crecimiento y la proliferación celular, en estudios clínicos llevados a cabo con animales se demostró que VK<sub>2</sub> juega un papel clave y dominante en la deposición de calcio en el hueso durante el metabolismo óseo (Bai et al., 2023).

Así mismo se halló que la adición de una pequeña cantidad de vitamina D<sub>3</sub> al diluyente de semen mejora la capacidad antioxidante total (TAC) y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) lo que permite la reducción del estrés oxidativo así mismo redujo el daño en la calidad espermática ocasionada por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hakim et al., 2023).

Diversas investigaciones han evidenciado que la Menaquinona-4 además tiene efectos positivos en la salud cardiovascular y la prevención de enfermedades como la osteoporosis, en los animales es un regulador del proceso de coagulación, además de sus beneficios en la salud ósea principalmente como un agente mineralizador (Dourado Villa, 2019). Al momento no existen estudios sobre la influencia de la Menaquinona 4 por lo que es necesario incrementar los estudios respecto a su función en la fecundación, pues al momento los desafíos se centran en los diversos enfoques nutricionales y suplementos para mejorar la calidad espermática (Higdon, 2000).

## Materiales y Métodos

Este estudio se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Unidad Académica de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Cuenca ubicada en el cantón Cuenca provincia del Azuay, en un periodo de 8 meses se evaluó el efecto de la Menaquinona en dosis de control (1mM; 10mM), en semen diluido de ovinos de las razas Dorper, Katahdin y Pelibuey, en un lapso de 11 días se estudió semen libre de tratamiento.



Figura 1. Ubicación de la Facultad de Veterinaria y Agronomía Universidad Católica

Fuente: (Google Maps, s. f.)

Se utilizaron 3 ovinos machos de las razas (Dorper, Katahdin y Pelibuey) para implementar un programa de inseminación artificial (IA). Para la obtención del semen se seleccionó una oveja hembra sosteniendo firmemente la vagina con la mano derecha y guiando el prepucio en un ángulo de 45 grados desde el suelo, esto facilitó una monta rápida y la eyaculación, la muestra obtenida se almacenó en un tubo de recolección procurando protegerlo de los cambios bruscos de luz y temperatura posteriormente se sumergió en baño maría a 37 °C.

Posteriormente se evaluó la motilidad masal e individual, para determinar la motilidad masal (MM; %) se utilizó una platina térmica previamente calibrada a 37°C, luego se depositó una gota de semen puro (5 µl) en un portaobjetos y cubre objetos, y se observó con un microscopio óptico con un aumento de 10x. De acuerdo al grado de movimiento se otorgó un porcentaje a partir de una escala del 1 al 5, 1 tuvo una valoración de 24% de espermatozoides móviles y 5 un 100%, de igual forma la motilidad individual progresiva (MIP).

Luego se procedió a colocar 30 µl de semen sobre una micro cubeta, para determinar su concentración, posteriormente se la llevó al fotómetro SDM 1 (minitube) específico para ovinos.

### *Criopreservación del semen*

Para lograr la criopreservación se aplicó una solución de Triladyl, yema de huevo y agua ultra pura (1:1:3), a partir de ello se elaboró una solución en conjunto con el semen (1:1) esta se conservó temporalmente en baño María a 37 °C.

El siguiente paso fue la elaboración de una solución madre con el mismo procedimiento base, para lo cual se utilizó volumen seminal x la concentración y Motilidad Masal x Motilidad Individual, con una estimación del 80 % de MM, y 80% MI. Este resultado se divide por la concentración estimada de cada pajuela (50 millones) de esta manera obtuvimos el número de pajuelas a procesar.

Este valor fue dividido para 4 debido que se utilizó pajuelas de 0.25 cc, obteniendo el volumen de la solución madre, el mismo al que se restó el volumen de la pre disolución. Consiguientemente se combinó la pre disolución y la solución madre obteniéndose así la solución Final del trabajo.

### *Tiempo de estabilización*

Se procedió a colocar las pajuelas en refrigeración en un lapso de 2 horas a 5 °C para su proceso de adaptación.

### *Congelación de Semen*

Las pajuelas se colocaron en una rampa denominada “Unidad de congelación de pajuelas minitube” en vapores de nitrógeno a una altura de (5.5 cm) durante 15 minutos, posteriormente las pajuelas son sumergidas en el nitrógeno líquido y con una pinza se colocó en los globets rotulados con su diferente tratamiento, posteriormente fueron introducidos en el nitrógeno líquido para facilitar su conservación a -196 °C.

### *Descongelación del semen*

Se utilizaron pajillas previamente congeladas y se las colocó en un termo con agua a una temperatura de 37°C durante un minuto, posterior se realizó un secado cuidadoso para evitar el contacto del semen con el agua luego se cortaron los extremos de cada pajilla para transferir el contenido hacia un tubo Eppendorf adecuadamente rotulado.

### *Integridad de la membrana post descongelamiento*

En esta fase de la investigación se preparó una combinación de 20  $\mu\text{l}$  de la muestra post-descongelación con 100  $\mu\text{l}$  de solución Host en un tubo Eppendorf, una vez se ha homogenizado la muestra se incubó a una temperatura de 37°C en una platina termorreguladora durante 45 minutos, el análisis microscópico se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de la muestra en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos, en el microscopio se observó espermatozoides con una torsión en el flagelo helicoidal siendo estos los que reaccionaron positivamente a la prueba de Host.



Figura 2. Integridad de la membrana post descongelamiento

### *Vitalidad post descongelamiento*

Para el análisis de la calidad morfológica del semen se procedió a la aplicación de Eosina-nigrosina 3  $\mu\text{l}$ , luego se colocó y homogeneizó la muestra en un portaobjetos mediante un frotis, el análisis microscópico mostró que los espermatozoides muertos presentaron coloración, al contrario, los vivos no mostraron problemas en la integridad de su membrana plasmática.

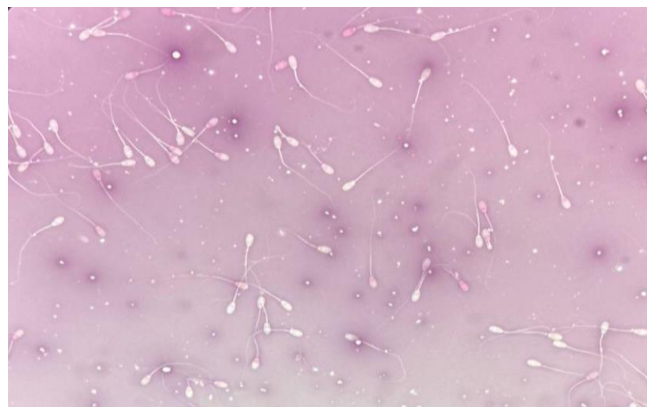


Figura 3. Vitalidad post descongelamiento

### *Viabilidad espermática post descongelamiento*

El próximo paso fue el análisis de los espermatozoides vivos y muertos apoyado en el método de tinción fluorescente dual, se preparó la muestra en un tubo Eppendorf, donde se añadieron 50  $\mu$ l de muestra seminal y se incorporaron 3  $\mu$ l de yoduro de propidio se esperó se actúe 15 minutos, luego se realizó un frotis de la mezcla para proceder con la observación para lo cual se determinó que los espermatozoides que se colorean son los que presentan problemas del saco acrosomal.

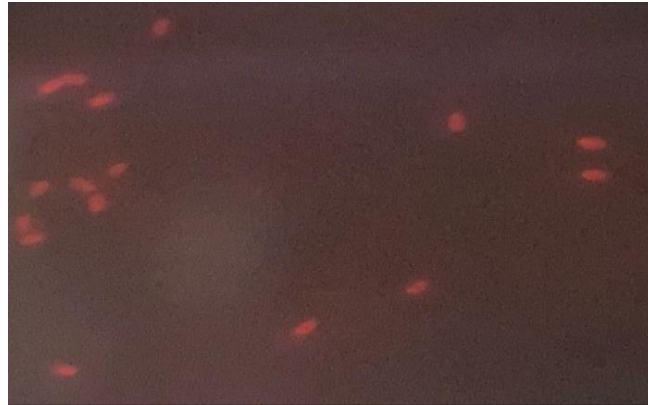


Figura 4. Viabilidad espermática post descongelamiento

### *Análisis de la funcionalidad mitocondrial*

Para evaluar la funcionalidad mitocondrial se estudió la actividad de las mitocondrias de los espermatozoides apoyando el método de tinción fluorescente, esta muestra seminal fue preparada en un tubo Eppendorf al que se agregaron 50  $\mu$ l de semen y 1  $\mu$ l de Rodamina 123, se esperó por un lapso de 10 minutos para continuar con la siguiente preparación se examinó bajo un microscopio fluorescente. Los espermatozoides que se colorean de verde son los que presentan funcionalidad mitocondrial.



Figura 5. Funcionalidad Mitocondrial post descongelamiento

### *Análisis Estadístico*

Se empleó la estadística descriptiva y analítica mediante un análisis factorial 3 x 5 que consistió en que, por cada una de las 3 razas de ovinos donantes se obtuvo 5 eyaculados, a los que se realizó un análisis de varianza (ADEVA) a un nivel de significancia 5% en las variables y una prueba multiparamétrica (post – hoc) de Tukey. Para los resultados se utilizó la media y la desviación estándar.

### *Diseño Experimental*

En el análisis experimental se describió las variables dependientes: motilidad, que se divide en dos tipos: la motilidad progresiva (MP) y motilidad total (MT), la vitalidad y la presencia de anomalías en los espermatozoides, de igual manera se procedió a evaluar el desplazamiento espermático en micrómetros por segundo (VCL), velocidad promedio en micrómetros por segundo (VAP), velocidad con trayectoria rectilínea en micrómetros por segundo (VSL), los parámetros de relación como , rectitud en porcentaje (STR), linealidad en porcentaje (LIN) y la oscilación en porcentaje (WOB), la amplitud del desplazamiento de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batido del flagelo (BCF).

Las variables independientes evaluadas fueron: presencia de Menaquinona 4 como tratamiento y el grupo testigo que utiliza semen libre de Menaquinona 4 para comparación y control en la siguiente investigación.

### **Resultados**

Se realizó dos tipos de análisis, el primero bajo un modelo de una entrada para evaluar el efecto de las razas y el segundo evaluó los Tratamientos.

En el cuadro 1 se demuestra las diferencias estadísticas entre calidad espermática entre razas usando la técnica anova de un factor de Welch. Al evaluar las razas Pelibuey, Dorper y Katahdin en las pruebas de: Eosina, Host, Yoduro y Rodamida no hubo diferencia significativa ( $p > 0.005$ ) al igual que las pruebas (progresivo, no progresivo, inmóviles, velocidad curvilínea, velocidad media, velocidad lineal, índice de rectitud, índice de linealidad, amplitud de la cabeza y frecuencia de batida de cola) donde no presentó diferencia significativa, ( $p > 0.005$ ).

**Cuadro 1.** ANOVA de un Factor (Welch) para la Calidad espermática entre razas.

VARIABLE	F	gl1	gl2	P
EOSINA	1.32850	2	36.2	0.277
HOST	0.00650	2	37.5	0.994
YODURO	2.33294	2	36.4	0.111
RODAMIDA	0.37137	2	37.3	0.692
PROGRESIVO	0.63892	2	36.6	0.534
NO PROGRESIVO	1.01487	2	37.7	0.372
INMOVILES	0.53064	2	37.0	0.593
VCL	0.42168	2	37.9	0.659
VAP	0.36374	2	37.9	0.697
VSL	0.44439	2	37.7	0.645
STR	1.95747	2	37.3	0.155
LIN	0.82029	2	37.2	0.448
ALH	0.41371	2	37.9	0.664
BCF	0.07795	2	37.9	0.925

En el cuadro 2 se observa los resultados del ANOVA de un factor, que compara las muestras frente al semen fresco demuestra que hubo diferencias estadísticas en las pruebas de: (yoduro, rodamida, no progresivo, inmóviles, velocidad curvilínea, velocidad media, velocidad lineal, amplitud de la cabeza y frecuencia de batida de cola) ( $p < 0.001$ ), mientras que las pruebas que no mostraron significancia son las de Host con: 0.017, Progresivo con:  $p=0.366$ , Índice de rectitud con:  $p=0.121$ , Índice de linealidad con  $p=0.394$ .

**Cuadro 2.** ANOVA de Un Factor (Welch) de la calidad espermática con semen fresco

VARIABLE	F	gl1	gl2	P
EOSINA	5.41	3	30.7	0.004
HOST	3.99	3	29.8	0.017
YODURO	17.18	3	29.9	< .001
RODAMIDA	36.31	3	30.8	< .001
PROGRESIVO	1.09	3	30.9	0.366
NO PROGRESIVO	21.80	3	30.9	< .001
INMOVILES	12.59	3	30.2	< .001
VCL	23.65	3	28.6	< .001
VAP	23.15	3	29.3	< .001
VSL	21.41	3	30.2	< .001
STR	2.10	3	29.3	0.121

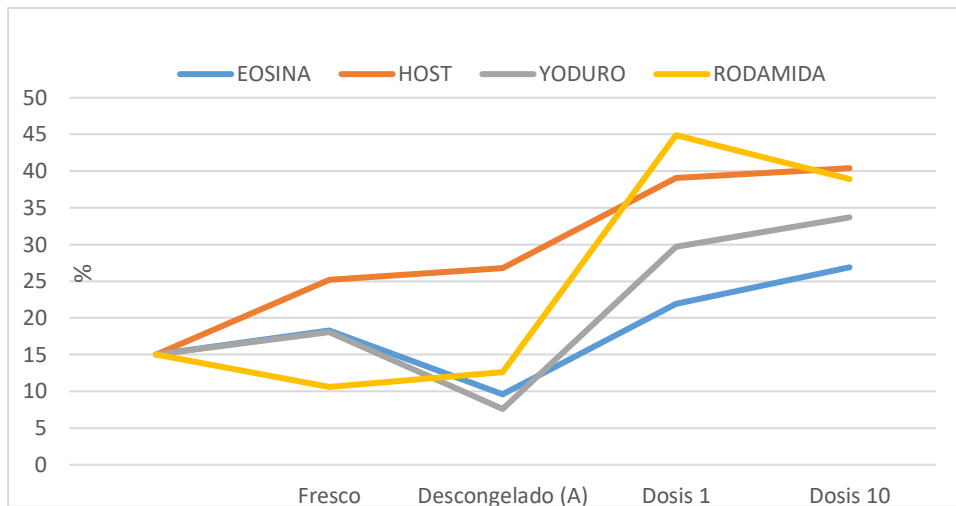
LIN	1.03	3	28.4	0.394
ALH	24.19	3	28.7	< .001
BCF	15.85	3	30.8	< .001

**Cuadro 3.** Análisis comparativo (ANOVA) entre dosis y muestras post-descongelación

DOSIS	N	1%	10%	Descongelado	Valor p
EOSINA (%)	15	21.9(±11.4) <sup>a</sup>	26.9(±14.3) <sup>a</sup>	9.60(±10.6) b	0.001
HOST (%)	15	39.1(±9.23) <sup>a</sup>	40.4(±14.5) <sup>a</sup>	26.8(±15.6) b	0.014
YODURO (%)	15	29.7 (±12.1) <sup>a</sup>	33.7(±14.3) <sup>a</sup>	7.60(±8.59) b	<0.001
RODAMIDA (%)	15	44.9(±12.8) <sup>a</sup>	38.9(±12.3) <sup>a</sup>	12.6(±9.44) b	0.508
PROGRESIVO (%)	15	25.2(±12.8) <sup>a</sup>	26.0(±15.5) <sup>a</sup>	30.9(±14.8) b	<0.001
NP (%)	15	28.3(±13.6) <sup>a</sup>	32.0(±16.4) <sup>a</sup>	63.4(±18.2) b	<0.001
INM (%)	15	46.5(±23.3) <sup>a</sup>	42.1(±27.1) <sup>a</sup>	6.07(±18.6) b	<0.001
VCL (µm/s)	15	36.9(±12.6) <sup>a</sup>	37.3(±10.4) <sup>a</sup>	104(±40.8) b	<0.001
VAP (µm/s)	15	21.3(±8.17) <sup>a</sup>	21.8(±7.80) <sup>a</sup>	57.8(±21.2) b	<0.001
VSL (µm/s)	15	15.0(±6.96) <sup>a</sup>	15.2(±6.44) <sup>a</sup>	37.7(±11.8) b	<0.001
STR (%)	15	60.8(±9.02) <sup>a</sup>	59.2(±9.25) <sup>a</sup>	60.8(±7.02) b	0.838
LIN (%)	15	35.1(±12.6) <sup>a</sup>	34.2(±14.1) <sup>a</sup>	36.8(±8.82) b	0.836
ALH (µm)	15	1.18(±0.24) <sup>a</sup>	1.18(±0.24) <sup>a</sup>	2.80(±0.94) b	<0.001
BCF (Hz)	15	4.28(±2.74) <sup>a</sup>	4.55(±2.50) <sup>a</sup>	10.5(±3.66) b	<0.001

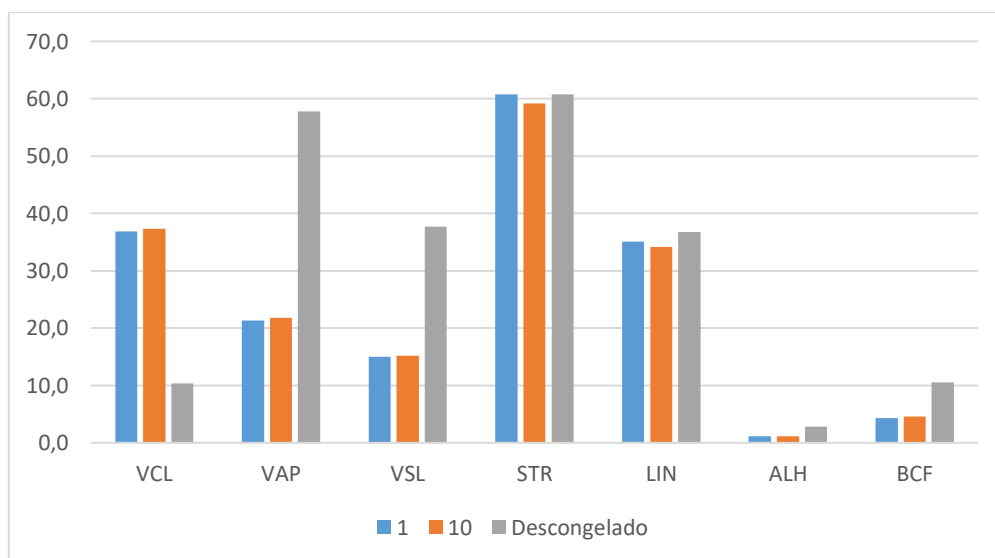
En la evaluación con respecto a las dosis, presentada en el Cuadro 3, se demostró que en las variables que muestran significancia ( $p < 0.001$ ) se encuentran: yoduro de propidio, progresivos, no progresivos, inmóviles, velocidad curvilínea, velocidad media, velocidad lineal, amplitud de la cabeza y batida de cola presentan una alta significancia. Solamente STR%, LIN% y Rodamida% no presentaron diferencias estadísticas, a favor de las Dosis empleadas.

Con respecto a la variable no progresivos (NP) en la muestra descongelada cuenta con un valor superior con respecto a las otras dos dosis con 63.4% (±18.2); mientras en la dosis 1% tiene un valor de 28.3% (±13.6) y en la dosis 10% un valor de 32.0% (±16.4), siendo estadísticamente similares estas dos, y demostrando que el tratamiento del uso de la Menaquinona 4 reduce el daño celular posiblemente debido a su capacidad de neutralizar los radicales libres, dando como resultado espermatozoides más activos. Mientras que la prueba de Host muestra diferencia entre las dosis 1%: 39.1% (±9.23) y 10%: 40.4% (±14.5), con respecto al descongelado: 26.8% (±15.6); ( $p = 0.014$ ).



**Figura 6.** Análisis de la calidad y permeabilidad de la membrana

En la figura 6, se puede apreciar el análisis en semen fresco, descongelado, Dosis 1% y Dosis 10%, donde se evidencia que los valores en las dosis con Menaquinona 4 son superiores al semen descongelado.



**Figura 7.** Variación de la cinética

En la figura 7 se puede apreciar que el color gris que representa al semen descongelado muestra diferencia con relación a la Dosis 1% (color azul) y Dosis 10% (color naranja) mismas que no muestran mayor diferencia significativa, sin embargo, en la prueba de Índice de rectitud (STR) e Índice de linealidad (LIN) no muestran diferencias significativas con relación al semen descongelado y dosis con tratamiento de vitamina K<sub>2</sub>.

## **Discusión**

Es importante partir indicando que al momento no existen estudios relacionados al estudio del efecto de la Menaquinona en la crioconservación del semen ovino, los resultados de este estudio en este estudio se conocieron que la adición de Menaquinona al semen ovino en el proceso de crioconservación aporta a preservar las funciones espermáticas sin experimentar alteraciones significativas y preservando la permeabilidad de la membrana seminal en la fase de post descongelación.

El estudio, de Stéphenne et al. (2010) se halló que la LDH (Prueba de lactato deshidrogenasa) en ovinos está localizado en espermatozoides cuando hay una fuga hay una correlación con el daño a la membrana celular, al presentar un aumento de LDH en el semen postdescongelado no mostró correlación con la motilidad, viabilidad, MFI e IA de los espermatozoides, así mismo se observó que la fuga de LDH durante todas las etapas de la crio preservación, esto podría usarse como un marcador del daño a la membrana en el proceso de incubaciones previas a la congelación como después de la descongelación.

El estudio de Agarwal y Sharma (2014) dio a conocer que existe una relación directa entre la morfología de los espermatozoides y el equilibrio oxidativo pues su morfología es la característica más importante al evaluar el semen, siendo esta una información clave para conocer el potencial de la fertilización que, junto a la información respecto a la calidad del semen, la producción de ROS, permitirán evaluar la calidad de semen. Se observó que cuando el semen posee anomalías morfológicas conjuntamente con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un mayor daño a los espermatozoides, conduce a la infertilidad.

Los autores Snoeck et al. (2023) evaluaron el efecto de los antioxidantes no enzimáticos sobre los extensores con LDL (Prueba de lactato deshidrogenasa) reemplazando la yema de huevo en el extensor Tris-Glucosa para la criopreservación de esperma de carnero, se adicionó además 10 mM de HB en el extensor Tris-Glucosa con 8% de LDL. Luego de la descongelación las muestras de los Experimentos I y II se mantuvieron en un baño seco (38 °C), y la motilidad total, VCL y LIN se evaluaron mediante CASA después de 1, 2 y 3 h de incubación. Luego de la incubación se logró mejorar la velocidad, reducción de la motilidad total de los espermatozoides, por el contrario, se halló que adicionando ácido ascórbico y trehalosa es perjudicial para la motilidad del esperma.

En el estudio de Hara et al. (2010) se evaluó el efecto de la duración del almacenamiento, la temperatura de almacenamiento y el diluyente sobre la viabilidad y fertilidad del esperma fresco de carnero, después de 72 horas de recolectar la muestra de semen se pudo evidenciar una mejor motilidad luego de su almacenamiento a 5 °C que después del almacenamiento a 15 °C; mientras que las tasas de preñez refrigerado disminuyeron hasta las 72 h (60, 52, 30 y 18% para 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente, por tanto se concluye que el almacenamiento fresco de semen de carnero a 5 °C es superior al almacenamiento a 15 °C, (2) con una alta proporción de espermatozoides conservan su capacidad para fecundar.

Por su parte Campuzano et al. (2014) hallaron que las células espermáticas de mejor calidad tienen diferencias significativas sobre la motilidad progresiva, la viabilidad y el daño acrosómico luego de haber sido almacenado a 15 °C que después del almacenamiento a 5 °C hasta 48 h, así también se halló que el estado acrosómico se afectó ligeramente debido al diluyente y antioxidante, mientras que la actividad mitocondrial mejoró con los antioxidantes en TTF-SL (Tris Lecitina de soja) y GSH (glutathion reducido) a 5 mM cuando el semen se almacenó a 5 °C en TTF-EY. Por tan se concluye que el uso de los antioxidantes permitió mejores efectos respecto a la composición del diluyente en la calidad del semen, así como el uso de Trolox (análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol) afectó negativamente la calidad del esperma.

De acuerdo con el estudio de Torres et al. (2019) se demostró que la adición de varios antioxidantes al semen ovino reduce la degradación celular, mejora la motilidad y la habilidad fertilizante *in vitro*, el Trolox es un análogo de la vitamina E soluble en agua, mismo que mejora la calidad del semen posdescongelación, mientras que la isteamina ayudó a la limpieza de radicales y de esta manera mantener el estado redox en las células con una concentración de 6 mM incrementó la viabilidad, motilidad y funcionalidad de la membrana además disminuyó la peroxidación lipídica en los espermatozoides ovinos.

Mientras que en el estudio de Anel et al. (2003) se halló que al adicionar glicerol al semen del ovino redujo la motilidad del esperma y la integridad acrosómica, lo que conduce a una reducción de la fertilidad después de la IA, con una tasa de motilidad del esperma de 79% y el 69% en el semen diluido con diluyentes que contenían 0% y 7% de glicerol, respectivamente, ante estos resultados se sugiere el uso más bajo de glicerol para mantener la integridad acrosómica, sin embargo, también se abordó la influencia de

ciertos factores en el uso de glicerol para la criopreservación de semen entre las cuales están: la preparación de los diluyentes, el tiempo empleado en preparar la muestra antes de la congelación, el rendimiento y repetibilidad del procedimiento de congelación enfocados en incrementar la homogeneidad de la muestra.

## Conclusiones

El proceso de criopreservación de las muestras de semen van desde la preparación y dilución de los espermatozoides que van desde el mantenimiento de la capacidad funcional después de la descongelación, en las distintas etapas, se necesita que los espermatozoides mantengan sus atributos funcionales que aseguren su capacidad de fertilización.

Existen diversas alternativas para preservar la calidad seminal en los procesos de crioconservación entre los cuales están la adición de LDL naturales y de yema de huevo los cuales buscan favorecer la viabilidad del espermatozoides después del proceso de congelación y descongelación, del mismo modo se está indagando el rol de las vitaminas A y C que por su capacidad antioxidante aporta la reducción de radicales libres y estrés oxidativo.

La conservación del semen ovino para la reproducción asistida ha logrado grandes progresos aun no existen estudios que avalen el efecto de la vitamina K<sub>2</sub> para preservar su fertilidad en el proceso de congelación y post-congelación. Así mismo se ha probado el rol de los crioprotectores principalmente el aporte del glicerol sin embargo el mismo está limitado por su toxicidad.

En este estudio se conoció que la Menaquinona incrementó la calidad y permeabilidad de la membrana seminal en el proceso post descongelación sin alterar sus funciones significativas, razón por la cual la capacidad de movimiento de los espermatozoides no se vio afectada lo que implica un alto porcentaje de éxito para lograr una gestación.

Al incorporar Menaquinona 4 al semen ovino en condiciones de congelación se benefició positivamente a las funciones espermática sin que ello implique una alteración significativa, por lo cual este estudio tiene efectos positivos en congelación del semen ovino.

Se recomienda incrementar los estudios que permitan profundizar en la adición de la menaquinona en la crioconservación en ovinos y con ello aportar desde lo teórico práctico a la medicina veterinaria a partir de una nueva estrategia de fecundación artificial.

Sería interesante comparar la adición de la Menaquinona-4 en la crioconservación para preservar la calidad seminal vs la adición de LDL naturales y de yema de huevo y de esta manera concluir cuál de los compuestos naturales tuvo mejores resultados.

Se requiere profundizar sobre las afectaciones en la motilidad lo que implica indagar sobre la forma de los espermatozoides la cual está en constante cambio pues ello influye directamente en el metabolismo y funcionamiento pues ambos afectan a su movimiento flagelar y velocidad, del mismo modo comprender teóricamente los procesos de maduración, capacitación e hiperactivación.

Es importante indagar el papel de la vitamina K también en su aporte a la salud cardiovascular de los animales puesto que tiene funciones regulatorias al proceso de coagulación, así mismo su beneficio en la salud ósea misma que aporta a la formación y mineralización de los huesos.

## Bibliografía

- Agarwal, A., & Sharma, E. (2014). *Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility*. Obtenido de *Reprod Biol Endocrinol*, 27;(12):10-45.: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24884815/>
- Allai, L., Benmoula, A., Maia, M., & Nasser, B. (2018). *Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate*. Obtenido de *Animal Reproduction Science*, 192(12): 6-17: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432017308746?via%3Dihub>
- Anel, L., de Paz, P., Alvarez, M., & Chamorro, A. (2003). *Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen*. Obtenido de *Theriogenology*, 60(7): 293-308: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14511783/>
- Bai, H., Kawara, M., & Takahashi, M. (2023). *Identification of menaquinone-4 (vitamin K2) target genes in bovine endometrial epithelial cells in vitro*. Obtenido de *Theriogenology*, 1(198):183-193: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X22005556?via%3Dihub>
- Bester, N. (2008). *Effect of different dietary energy levels on productive and reproductive traits in Dorper rams*. Obtenido de University of the Free State, Bloemfontein: <https://scholar.ufs.ac.za/items/c77fde30-d7f6-4e8c-b344-282e894287c9>
- Campuzano, M., Rodriguez, M., & Tamayo, L. (2014). *efrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: effect of temperature, extender and storage time*. Obtenido de *Anim Reprod Sci*;151(3-4):137-147: doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.006
- Dourado Villa, J. (2019). *Efecto de la suplementación con vitamina k2 (menaquinona-7) y calcio en la salud ósea y vascular de ratas*. . Brasil : Vicoso.
- Feijó, A. (2018). *Valoración económica de la reproducción de ovinos Pelibuey y Black Belly*. Obtenido de ESPOCH : <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9052/1/20T01081.pdf>
- Fernández, D., Guerin, Y., Irabuena, O., & Dacheoux, J. (2006). *Efecto de los diluyentes para la conservación del semen refrigerado y del momento de la inseminación sobre la fecundidad ovina*. Obtenido de *Producción Ovina*, 18: ( 41 - 47): [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_ovina/inseminacion\\_ovinos/21-Fernandez\\_Abella.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/21-Fernandez_Abella.pdf)
- Hakim Abed Bresm M, M. H. (2023). *Effect of Vitamin D3 on some Antioxidant Parameters in Chilled Semen in Awassi Ram*. . *Arch Razi Inst*, 30;78.

- Hakim, M., & Hassan, H. (2022). *Effect of Vitamin D3 on some Antioxidant Parameters in Chilled Semen in Awassi Ram*. Obtenido de Archives of Razi Institute, 78(2):681-687: [https://archrazi.areeo.ac.ir/article\\_127345.html](https://archrazi.areeo.ac.ir/article_127345.html)
- Halder M, P. P. (2019). Vitamin K: Double Bonds beyond Coagulation Insights into Differences between Vitamin K1 and K2 in Health and Disease. *Int J Mol*, 896.
- Hara, Q., Richardson, L., & Donovan, A. (2010). . *Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm*. Obtenido de *Theriogenology*. 2010;73(4):541–549: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20004009/>
- Higdon, J. (2000). Vitamina K . *Centro de Información de Micronutrientes*, 1-2.
- Ikeda, S., Kitagawa, M., & Imai, H. (2005). *The Roles of Vitamin A for Cytoplasmic Maturation of Bovine*. Obtenido de Journal of Reproduction and Development, 51 (1):1-13: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/51/1/51\\_1\\_23/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/51/1/51_1_23/_pdf/-char/en)
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos* . (2020). Obtenido de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-produccion-agropecuaria-continua/>
- Mahoete, N. (2010). *In Vitro Embryo production and semen cryopreservation in sheep*. Obtenido de Faculty of Natural and Agricultural Sciences: <https://scholar.ufs.ac.za/server/api/core/bitstreams/f70f625f-ba81-48d9-9d68-cbfe0b44d1f1/content>
- Marle - Köster, E., & Visser, C. (2018). Genetic Improvement in South African Livestock: Can Genomics Bridge the Gap Between the Developed and Developing Sectors? *Geneta delantera*, 23 ,9 : 3331.
- Martínez , J., Duverger , O., Díaz, N., & Alvarez , L. (2022). *Efecto de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina en la congelabilidad del semen caprino*. Obtenido de Revista MVZ Córdoba, 27(2): 1-12: <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/2632/4324>
- Neves , M., Heneine, L., & Henry, M. (2014). *Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa*. Obtenido de Med. Vet. Zootec, 66 (3): 1-16: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/f9jQL4D3qxjj5McdVdMngQx/?lang=en>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. (2016). Obtenido de <http://www.fao.org/statistics/es>
- Parkinson , T., & Morell, J. (2018). *Artificial Insemination*. Obtenido de <https://veteriner.erciyes.edu.tr/EditorUpload/Files/fa31df81-ef00-4ad4-90ed-6e710d520a16.pdf>
- Ruiz, L., Santiani, A., Sandoval , R., & Huanca , W. (2007). *Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris*. Obtenido de Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 18(2):

1-15: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172007000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172007000200003)

Sáenz García, A. A. (2015). *Ovinos y Caprinos*. Recuperado el 22 de March de 2024, de CENIDA – UNA: <https://cenida.una.edu.ni/textos/nl01s127o.pdf>

Sandoval , R., & Santiani, A. (2007). *Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes*. Obtenido de Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru 18(2):107-114:

[https://www.researchgate.net/publication/262785475\\_Criopreservacion\\_de\\_semen\\_ovino\\_empleando\\_tres\\_dilutores\\_y\\_cuatro\\_combinaciones\\_de\\_agentes\\_crioprotectores\\_permeantes\\_y\\_no\\_permeantes](https://www.researchgate.net/publication/262785475_Criopreservacion_de_semen_ovino_empleando_tres_dilutores_y_cuatro_combinaciones_de_agentes_crioprotectores_permeantes_y_no_permeantes)

Seadawy, I., Kotp, M., Abo, M., & Fadl, A. (2022). *The impact of varying doses of moringa leaf methanolic extract supplementation in the cryopreservation media on sperm quality*. Obtenido de Tropical Animal Health and Production, 54 (12):344-354: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11250-022-03344-y.pdf>

Snoeck, P., Camara, D., & Moura, L. (2023). *Post-thaw quality of ram sperm frozen with different concentrations of low-density lipoproteins associated with non-enzymatic antioxidants*. Obtenido de Anim Reprod, 20(1): 1-15 : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10127573/>

Stéphenne , X., Najimi, M., & Sokal, E. (2010). *Hepatocyte cryopreservation: Is it time to change the strategy?* Obtenido de Revista Mundial de Gastroenterología, 16:(1) 1-18:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2799904/#:~:text=Cryopreservation%20remains%20the%20best%20option,the%20morphological%20and%20functional%20levels>.

Umar , S., Ahmad , M., & Zubair , M. (2018). *Correlation of biochemical constituents of seminal plasma with semen quality in Teddy goat (Capra hircus) bucks*. Obtenido de Andrología; 50(3): 1-17: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29230840/>

Valverde, A., & Madrigal, M. (2018). *Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal I*. Recuperado el 30 de January de 2024, de Redalyc: <https://www.redalyc.org/journal/437/43755165018/html/>

Yanez-Ortiz, I., Catalán , J., Rodriguez - Gil , J., Miró, J., & Yeste, M. (2022). *Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep*. *Animal Reproduction Science*, volumen 206.

Cuenca, 23 de septiembre de 2024

**Asunto:** Embargo Temporal del Trabajo de Titulación

Señora

**Ing. Verónica Vivar Serrano.**

**Decana de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias.**

Cuenca.

De mi consideración:

Señora Decana, Yo Juan Carlos Zuña León como autor del Trabajo de Titulación “**Efecto de la concentración de la Menaquinona-4 en semen ovino post congelación**” y Dr. Andrés Leonardo Moscoso Piedra Msc. como director de la misma, solicitamos a usted y por su digno intermedio a Biblioteca y al responsable del repositorio institucional, el EMBARGO TEMPORAL del mismo, por un lapso de 18 meses con la finalidad de evaluar su contenido con fines de: evaluación de artículo científico para publicación en revista. Entiendo que luego de vencido este período automáticamente la obra será puesta a disposición del público bajo las normas de gestión de la Universidad.

Por la atención que sepa dar al presente, nos suscribimos de usted muy agradecidos.



---

CI: 0104789599

Juan Carlos Zuña León

Autor.

**C.C.: Biblioteca.**