



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA MENAQUINONA-4

SOBRE EL SEMEN OVINO EN REFRIGERACIÓN

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL

TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA

AUTORA: MARÍA BELÉN FAICÁN PAUTA

DIRECTOR: DR. ANDRÉS 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.

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA MENAQUINONA-4
SOBRE EL SEMEN OVINO EN REFRIGERACIÓN**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

AUTORA: MARÍA BELÉN FAICÁN PAUTA

DIRECTOR: DR. ANDRÉS LEONARDO MOSCOSO PIEDRA MSC

CUENCA – ECUADOR

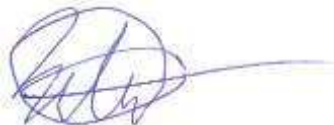
2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

María Belén Faicán Pauta portadora de la cédula de ciudadanía N° **0107966897**. Declaro ser la autora de la obra: “**Efecto de la concentración de la menaquinona-4 sobre el semen ovino en refrigeración**”, 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. Declaro 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, **25 de septiembre del 2024**



F:

María Belén Faicán Pauta

C.I. 0107966897

Certificación

Yo, **Andrés Leonardo Moscoso Piedra**, certifico que el presente trabajo “**Efecto de la concentración de la menaquinona-4 sobre el semen ovino en refrigeración**” Fue desarrollado por María Belén Faicán Pauta, 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, 05 de septiembre del 2024

ANDRES
LEONARDO
MOSCOSO
PIEDRA

Firmado digitalmente
por ANDRES
LEONARDO MOSCOSO
PIEDRA
Fecha: 2024.09.05
17:45:34 -05'00'

Dr. Andrés Leonardo Moscoso Piedra

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD CATOLICA DE CUENCA

Dedicatoria

En cada página de este gran proyecto se refleja el apoyo incondicional de quienes me rodean, encabezado por mis queridos padres, Humberto Faicán y Fany Pauta, quienes fueron las raíces que nutrieron mi pasión. Gracias a su esfuerzo y sacrificio, a los regaños cuando era necesario y a las palabras de aliento en los momentos más difíciles, me brindaron las herramientas para enfrentar cada desafío. Su ejemplo, su dedicación y su amor incondicional me han traído hasta este momento tan importante en mi vida, y por ello les estaré eternamente agradecida.

A mis hermanos mayores, Israel y Jorge, que siempre fueron mi ejemplo e inspiración. Con su dedicación y logros, me demostraron que los sueños son alcanzables y que el esfuerzo siempre vale la pena, siendo la luz en mi camino hacia el éxito. A mi familia en general, por ser el pilar de mi vida y comprender mis ausencias y sacrificios recordándome que el amor trasciende cualquier evento perdido, aunque no entendieran la mitad de los términos científicos que mencionaba y mis desvaríos sobre semen ovino.

Para mi fiel compañera Morita, que hizo que cada desvelo académico sea más llevadero con su lealtad y calidez ayudándome a sobrevivir este maratón académico. A esa persona especial que, aunque no sabía nada de semen de ovino, siempre me animó como si lo supiera, siendo un consuelo constante en mis momentos de estrés. Finalmente, y no menos importante, a mis amigos, que no solo me acompañaron en esta trayectoria, sino que también se convirtieron en mis compañeros de tesis. Gracias por compartir este camino, por su colaboración, apoyo y por las largas horas de trabajo juntos.

En resumen, esta tesis es el resultado de un viaje lleno de desafíos, risas y aprendizajes. A todos los que formaron parte de este capítulo de mi vida, les agradezco de corazón.

María Belén Faicán Pauta

Agradecimiento

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesis, el Dr. Andrés Moscoso Msc, por su orientación y apoyo incondicional a lo largo de este proceso. Su conocimiento y paciencia han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A los docentes de reproducción por sus consejos y charlas, que nos ayudaron a formarnos como profesionales. Gracias por hacernos reír y por hacer que el aprendizaje fuera más ameno, especialmente al Ing. Manuel Maldonado, quien, a pesar de que no le correspondía, siempre estuvo dispuesto a ayudarme con la estadística de esta tesis. Su dedicación y entusiasmo por la enseñanza fueron invaluable. Finalmente, gracias a todos los que, de una forma u otra, contribuyeron a que este logro fuera posible.

María Belén Faicán Pauta

Índice

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad.....	III
Certificación	IV
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice	7
Resumen	8
Abstract	9
1 Introducción.....	10
2 Fundamento Teórico	12
2.1 <i>Aspectos y Generalidades</i>	12
2.2 <i>Eficiencia Productiva</i>	13
2.3 <i>Menaquinona-4</i>	13
2.4 <i>Agentes Crioprotectores</i>	14
2.5 <i>Triladyl®</i>	14
2.6 <i>Evaluación Espermática</i>	14
3 Materiales y Métodos.....	15
3.1 <i>Proceso de campo</i>	15
3.2 <i>Proceso de laboratorio</i>	16
3.2.1 <i>Motilidad</i>	16
3.2.2 <i>Concentración Espermática</i>	16
3.2.3 <i>Pre-disolución</i>	16
3.2.4 <i>Solución Madre</i>	17
3.2.5 <i>Adición de Manaquinona-4</i>	17
3.2.6 <i>Empajuélalo</i>	17
3.2.7 <i>Estabilización de las Muestras</i>	17
3.3 <i>Evaluación es complementarias</i>	18
3.3.1 <i>Análisis del sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis)</i>	18
3.3.2 <i>Análisis de la viabilidad espermática</i>	18
3.3.3 <i>Integridad funcional de la membrana</i>	19
3.3.4 <i>Integridad y Potencial de la Membrana Mitocondrial</i>	20
3.4 <i>Análisis Estadístico</i>	20
4 Resultados	21
5 Discusión.....	25
6 Conclusiones.....	26
7 Bibliografía.....	28
8 Solicitud de embargo temporal de obra	34

Resumen

La conservación espermática es una de las prácticas con mayor impacto en la Medicina Veterinaria ayudando a pequeños y grandes ganaderos, integrando tecnologías genéticas modernas para mejorar la viabilidad y motilidad de los espermatozoides mediante el uso de antioxidantes como la menaquinona-4, MK-4 o vitamina K₂, la cual neutraliza el aumento de radicales libres. Este estudio tuvo como objetivo examinar el efecto de esta, en dosis de 1 mM y 10 mM sobre la calidad espermática de tres líneas de ovinos (Dorper, Kathadin y Pelibuey), los cuales participan en un programa de mejoramiento genético. Para este análisis se utilizaron 5 eyaculados de cada animal los cuales se evaluaron mediante pruebas de Host, Eosina-Nigrosina, Yoduro de Propidio y Rodamida, observando la viabilidad, integridad y potencial de la membrana mitocondrial, mientras que los parámetros de PR, NP, IM, VCL, VAP, VSL, STR, LIN, ALH y BCF fueron analizados por el sistema ASA (*Computer Asisted Sperm Analysis System*) arrojando resultados estadísticamente favorables al emplear dosis de 1 mM, y 10 mM. Mientras en la evolución de las 0, 24 y 48 horas, se vio una variación gradual en las pruebas de viabilidad e integridad, por otro lado, la raza Kathadin destacó en su calidad espermática, aunque el grupo fue homogéneo, concluyendo que el empleo de menaquinona-4 como antioxidante demostró ser un factor que ayuda a la criopreservación en el semen de ovino refrigerado. Estos resultados proporcionan nueva información para futuras investigaciones sobre el uso de menaquinona-4, en semen ovino y de otras especies.

Palabras clave

vitamina K₂; semen, criopreservación

Abstract

Sperm cryoconservation is one of the practices with the most significant impact in Veterinary Medicine, helping small and large farmers, integrating modern genetic technologies to improve the viability and motility of sperm through the use of antioxidants such as menaquinone-4, MK-4, or vitamin K2, which neutralizes the increase in free radicals. This study aimed to examine this effect at doses of 1 mM and 10 mM on the sperm quality of three sheep breeds (Dorper, Katahdin, and Pelibuey), which participate in a genetic improvement program. For this analysis, five ejaculated individuals from each animal were used, which were evaluated using Host, Eosin-Nigrosima, Propidium Iodide, and Rhodamide tests, observing the viability, integrity, and potential of the mitochondrial membrane. At the same time, the parameters of PR, NP, IM, VCL, VAP, VSL, STR, LIN, ALH, and BCF were analyzed by the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis System), yielding statistically favorable results when using doses of 1 mM and 10 mM. While in the evolution of 0, 24, and 48 hours, a gradual variation was seen in the viability and integrity tests. On the other hand, the Katahdin breed stood out in its sperm quality. However, the group was homogeneous, concluding that using Menaquinone-4 as an antioxidant proved to be a factor that helps cryopreservation in refrigerated sheep semen. These results provide new information for future research on using menaquinone-4 in sheep semen and other species.

Keywords

vitamin K2; semen, cryopreservation

1 Introducción.

La inseminación artificial es una de las prácticas con mayor valor significativo en los países en desarrollo para los productores de especies ovinas, caprinas, cerdos y bovinos, debido al consumo humano y la economía, aunque la producción ovina es más diversa; puede variar por factores culturales, creencias y recursos naturales en comparación con otras especies (cerdo y bovino), ya que estas se caracterizan por tener mayores prácticas estandarizadas en el mercado. Es importante tener un equilibrio de la producción e información hacia consumidor, aunque con el paso del tiempo la preferencia del consumo de carne ha ido inclinándose hacia la carne ovina por sus beneficios nutricionales (proteína, vitamina B y minerales), resaltando la importancia de estrategias para optimizar la industria ovina (Montossi et al., 2013).

Según la INEC, en el Ecuador, los resultados de este análisis informan que hasta el año 2019 se registraron un total de 464,644 ovinos en el país, en relación al año 2017- 2018, ha incrementado un 19.1% y 30.6%, las provincias con mayor producción son Chimborazo, Cotopaxi y Azuay, que se manejan con un sistema de producción de pastoreo, con monta natural y un bajo control sanitario en su mayoría. Mientras que para el año 2020 nos dice que se registra un total de 496.535, a nivel nacional aumentando levemente las cabezas de ovinos (Quishpi-Coronel, 2021).

Dada la situación de la producción ovina, es necesario comprender la dinámica reproductiva y el desarrollo de estas nuevas tecnologías, las cuales está estrechamente relacionado con la calidad espermática, siendo crucial para determinar el éxito de estas prácticas, sin embargo, los espermatozoides de estos pequeños rumiantes han demostrado ser más susceptibles en comparación con los espermatozoides de bovinos a la hora de someterse a temperaturas bajas (Cely et al., 2021).

La conservación del semen es primordial para la reproducción animal, mejorando la calidad de fertilización para las tecnologías de reproducción asistida, debido a que los espermatozoides constan de una estructura particular que no se encuentra en otras células animales y presentan una gran variación morfológica las cuales son sensibles a diversos factores como los cambios de temperatura, exposición directa a la luz, tiempo de almacenamiento y el pH ambiental ácido o alcalino (Wysokińska, 2022).

La aplicación de tecnología genética en la ganadería está transformando la producción a nivel global mediante un sistema comercial avanzado y flexible que beneficia tanto a pequeños como a grandes ganaderos, promoviendo el uso de la criopreservación (Marle-Köster & Visser, 2018), con el objetivo de mantener la viabilidad, funcionalidad y capacidad productiva a bajas temperaturas y prolongadamente (Jiménez-Aguilar et al., 2021).

Sin embargo, la calidad espermática puede variar después de la refrigeración o descongelación, enfrentando obstáculos para protegerse de los efectos negativos de la hipertonidad del diluyente, la cristalización del hielo y la peroxidación lipídica de sus membranas, siendo los carneros los más susceptibles a este último, en comparación con otras

especies de mamíferos, ya que su esperma contiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en su membrana plasmática (El-Seadawy et al., 2022).

La peroxidación lipídica provoca una disminución de la motilidad y la función espermatozoide – oolemma cuando se presenta el estrés oxidativo (ROS). Este se origina cuando la producción de especies reactivas de oxígeno es mayor que la capacidad de los antioxidantes en la célula, dando como resultado un daño en la membrana celular. Entonces, un alto contenido de ácidos grasos, una deficiencia de enzimas antioxidantes intracelulares y una capacidad limitada para reparar el ADN son razones por las que los espermatozoides son susceptibles al estrés oxidativo (ROS) (Khosravizadeh et al., 2022).

El incremento del estrés oxidativo es una de las causas del desgaste relacionado con la edad en los parámetros del semen. La peroxidación puede provocar cambios en su fluidez e integridad, perjudicando de manera directa la membrana plasmática y generando una capacidad reducida, de su motilidad y viabilidad (Kaltsas, 2023). Por lo cual, se ha ejecutado la utilización de antioxidantes, enzimas y sustancias no enzimáticas para el proceso de refrigeración y congelación como ventajas para mejorar la motilidad y vitalidad de los espermatozoides (Yáñez-Ortiz et al., 2022).

Según Rodríguez-Almeida et al., (2008), la refrigeración del semen a 5°C puede prolongar por mucho más tiempo la viabilidad en comparación con el semen congelado; no obstante, bajo estas temperaturas se ha observado hasta lapsos de 24 horas en carneros sin presentar cambios significativos. Se necesita incrementar notablemente la concentración espermática por dosis para alcanzar una efectividad parecida a la del semen testigo, pudiendo llegar a conservarse por más tiempo.

La refrigeración ha mostrado resultados importantes. Uno de los principales enfoques del semen refrigerado es aumentar el porcentaje de preñez alrededor de un 15% en comparación con el semen congelado, aunque los factores asociados a la disminución de la motilidad y fertilidad es la producción de especies reactivas, que se generan como efectos normales del metabolismo del semen refrigerado por lo cual es esencial que los antioxidantes y diluyentes mitiguen estos efectos (Crespilho et al., 2014).

Otros antioxidantes son las vitaminas C, E, A (beta caroteno) y un grupo de quinonas que conforma la vitamina K, que, junto con el glutatión, forman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos; de esta forma, neutralizan el potencial oxidativo (Zequeira & Eugenio, 2006).

La menaquinona-4 asimismo denominada (Mk-4), es una isoforma de la vitamina K₂ que ha resultado ser útil para la coagulación sanguínea, el metabolismo óseo, el tratamiento de enfermedades degenerativas, neoplásicas e inflamatorias, además de varias funciones biológicas que cumplen un papel vital en el organismo (Ushida et al., 2024). La MK-4 se puede hallar en huevos, pescado, riñones, hígado, mantequilla, leche y quesos fermentados. Estas menaquinonas son llevadas a través de lipoproteínas de baja densidad desde el hígado hacia los tejidos extrahepáticos como los huesos, a excepción de la MK-4 que es transportada en una densidad alta y baja (Díaz-Curiel, 2015).

Considerando que la vitamina K se encuentra en los forrajes verdes debido a la clorofila microbiana, principalmente en la alfalfa, que ha demostrado resultados ventajosos, pero con una velocidad de descomposición de proteínas rápida en el rumen (Jonker & Yu, 2016), la mayoría de los estudios se han enfocado en las vitaminas A, D y E por la falta de información, mientras que las investigaciones sobre la vitamina K han permanecido escasas (Bai et al., 2020).

Por lo antes mencionado, esta investigación pretende probar la hipótesis del empleo de menaquinona-4 como antioxidante que mejora la vitalidad y la calidad del esperma de ovinos después de la refrigeración, al reducir los efectos negativos del estrés oxidativo y proteger las estructuras celulares y el ADN. De este modo, empleando una dosis inferior para observar los actos fisiológicos favorables y una superior para ver el potencial a mayor concentración de menaquinona-4 en la preservación y funcionalidad espermática entre las dosis empleadas (1 y 10 mM de vitamina K₂) se buscando determinar la eficacia como antioxidante, evaluando su efecto en el semen de ovino en refrigeración y analizando la criopreservación del material genético de tres biotipos de reproductores pertenecientes a las razas Pelibuey, Dorper y Katahdin, comprendiendo el impacto de la vitamina para la capacidad antioxidante y beneficiando a la preservación y mejora genética.

2 Fundamento Teórico.

2.1 Aspectos y Generalidades

Los ovinos se caracterizan por su sistema digestivo sostenido y una alimentación herbívora, asimismo cuentan con lana de varias longitudes, texturas y colores según las razas y las zonas geográficas. En el ámbito del consumo alimentario este animal ha cambiado a nivel mundial, en Ecuador la provincia de Chimborazo se coloca como la octava provincia con mayor consumo de cárnicos, por lo que la cría ovina es importante para pequeños y medianos ganaderos debido a la sostenibilidad económica impulsando a una mayor demanda a las técnicas reproductivas (Garzón-Jarrín et al., 2024).

El avance tecnológico para el mejoramiento genético es un pieza esencial para la reproducción ovina, aumentando el crecimiento, la reproducción y la resistencia de parásitos en los corderos, estas características proporcionan una expansión en las industrias textiles lanar y alimentaria, como carne y leche brindando una fuente importante de proteína y grasa de alta calidad, por lo tanto, la cría de estos animales tienen un papel importante a nivel económico, social y ambiental (Thorne et al., 2021).

La oveja de raza Pelibuey, se caracteriza por su rusticidad y capacidad de adaptarse a distintos ambientes, climas y ser resistente a ciertas enfermedades, además de tener particularidades en el ciclo astral a lo largo del año. Esta raza tiene como objetivo las cruces inconsideradas con distintas razas para la producción de carne, poniendo en riesgo la diversidad genética (Aguilar-Martínez et al., 2021), en cambio, el rendimiento como tamaño y el peso al destete es inferior a otras razas con habilidades reproductoras de carne o lana. Su peso es de 45 kg en hembras y de 37 a 48 kg en machos, con ejemplares blancos, negros o cafés (Macías-Cruz et al., 2012).

Por otro lado, el Katahdin es una raza de borregos con ejemplares blancos, cafés o canelas escogidos por su conformación, crecimiento y prolificidad, después del destete a los 60 días se da su venta para el consumo, con un peso aproximado de 18 kg, mientras los pesos en adultos va desde los 60 a 65 kg en hembras, en tanto que los macho de 100 a 125 kg, sin embargo, de esta raza se conoce poco la variación genética para características de crecimiento de pre-destete (Manzanilla-Pech et al., 2012).

La raza Dorper es originaria de Sudáfrica, tiene un crecimiento rápido y su productividad está enfocada para el consumo cárnico, esta raza se utiliza con amplia frecuencia para el cruce paterno debido a que su peso al destete es elevado, llegando a pesar entre los tres y cuatro meses 36 kg, mientras que en su etapa adulta alcanza un peso de 113 kg (Cheng et al., 2022). Se considera una oveja de pelo fácil, es decir que no requieren corte de lana, desempeñándose en diversas condiciones ambientales y tiene fertilidad alta, no obstante, solo existe información genómica registrada (Qiao et al., 2022).

2.2 *Eficiencia Productiva*

La producción de pequeños rumiantes desempeña un papel clave tanto en el ámbito ambiental como socioeconómico. El manejo nutricional, reproductivo y la salud del rebaño es clave para un sistema de producción eficaz, aunque la rusticidad de estos animales hace posible que sean criados en un sistema de pastoreo con terrenos pobres, áridos y semiáridos, ya que tienen la capacidad de mantener las funciones productivas y reproductivas. Con el paso de los años, la exigencia de leche y productos cárnicos procedentes de estos animales ha experimentado un desarrollo relevante, lo que a su vez impulsa el progreso de técnicas de producción, enfocándose en la mejora genética, permitiendo un rápido progreso y ofreciendo la posibilidad de generar leche durante todo el año, corte de los ciclos reproductivos y aumento de la fertilidad y prolificidad, según el propósito de producción (Simões et al., 2021).

En cuanto a la producción de la carne de ovino muestra un aspecto crucial por su alta contenido nutrimental, El consumo per-cápita de la carne de este animal en Ecuador es de 9 kilogramos por persona al año, en el año 2010 se demostró un consumo total de 539.975 kg, mientras que en el año 2023 de 887.924 kg de carne (Feijoo León, 2018).

2.3 *Menaquinona-4*

La vitamina k es primordial para el funcionamiento adecuado del cuerpo, proviene de un grupo de moléculas liposolubles que actúa como un cofactor en la carboxilación de las proteínas dependientes de la vitamina K, las que se pueden distinguir en menaquinonas como la MK-4 provenientes de la vitamina k₂ que es producida principalmente por bacterias encontrándose en alimentos fermentados y carnes de ciertos animales (Bonardo & Leroy, 2024).

La vitamina k₂ tiene un rol fundamental en la activación de factores de coagulación regulando enfermedades cardiovasculares, también ayuda a la salud ósea en el tratamiento de la osteoporosis y aterosclerosis, además de mejorar los resultados en el cáncer, enfermedades

inflamatorias, el desarrollo de diabetes tipo II y enfermedades renales crónicas actuando dentro del hígado y transportándose por la circulación, por ende, la vitamina K₂ está presente en todo el cuerpo debido a los procesos de transporte por las lipoproteínas de baja densidad (Akbulut et al., 2020).

2.4 Agentes Crioprotectores

Los agentes crioprotectores CPA son esenciales para el proceso de criopreservación, este proceso puede intervenir en la integridad del material al momento de que el semen es sometido a bajas temperaturas resultado en un fenómeno osmótico y produciendo cristales de hielo, por lo tanto, los agentes crioprotectores se emplean para evitar el daño de transporte de agua, nucleación y protegiendo a los lípidos de daños en la membrana y otros componentes celulares como proteínas y ácidos nucleicos (Marcantonini et al., 2022).

Entre los crioprotectores más empleados está el glicerol, dimetilsulforxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), entilenglicol, propilenglicol, polímeros (pilianfolitos), trehalosa, sacarosa, etc. La gran parte de estos crioprotectores traspasan las membranas lipídicas y reemplazan un segmento de su contenido de agua. Por otro lado, los polímeros y carbohidratos como la glucosa, trehalosa, sacarosa y manitol no atraviesan la membrana, sino que estas proporcionan estabilidad interactúan con las cabezas polares, entonces se puede decir que los CPA se clasifican en dos grupos los que pueden atravesar la membrana y los que no tiene la capacidad de hacerlo (Boafo et al., 2022).

2.5 Triladyl®

El Triladyl® un diluyente comercial que se utiliza para la criopresevación en ovinos, caprinos y bovinos, en los procesos de refrigeración o congelación, su componente es basado en hidroximetil aminometono (Reyes-González1 et al., 2022), contiene tris, ácido cítrico, azúcar, soluciones tampón, glicerol, agua y antibióticos entre tilosina, gentamicina, espectinomicina, lincomicina (Abdel-Aziz Swelum et al., 2019).

Según Miclea & Varo-Ghiuru (2010), para el proceso de criopreservación con se realiza una relación 1:1:3 de Trilady, yema de huevo y agua destilada, la cantidad del diluyente va depender de la concentración final de espermatozoides, dicha solución tendrá que permanecer en enfriamiento hasta llegar a las 5 °C de esta manera presentando una estrategia para la preservación de la fertilidad y conservando de la viabilidad y capacidad espermática.

2.6 Evaluación Espermática

El análisis es un estudio necesario para las técnicas de inseminación artificial ofreciendo datos sobre la calidad del semen y la concentración de espermatozoides en la eyaculación, permitiendo evaluar su capacidad fertilizante mediante la evaluación de su vitalidad, morfología y actividad metabólica por medio de una evolución microscópica (Ávalos-Rodríguez et al., 2018)

El volumen del eyaculado de un ovino joven va de 0,5 a 0,7 ml, mientras que de un adulto es de 0,5 ml a 2ml, con una concentración espermática de 3.5×10^9 a 6.0×10^9 (Hafez, 2002) La calidad y cantidad de semen puede variar debido a diversos factores como la edad, temperatura ambiental, condición corporal, tamaño de los testículos, raza y temporada de reproducción. En la evolución seminal se observa ciertos parámetros, entre los que se encuentran coloración que puede ser amarillenta, grisácea, con presencia de células sanguíneas o eritrocitos y blanco cremoso, este último considerado como un aspecto normal del semen, mientras que su pH va entre 7.3 y 7.8, además es esencial identificar la presencia de espuma o burbujas que puede ser un inconveniente al momento de la lectura del volumen.

Por lo general, si en un eyaculado de ovino tiene un 15% del total de espermatozoides con anomalías como cabezas anormales, estrechez de la base, defectos del acrosoma, gota citoplasmática proximales o distales, tamaño diferente en la pieza media o cola doble, no son muestras aptas para los programas de inseminación artificial (López et al., 2010).

La vitalidad de los espermatozoides dependerá de la capacidad estructural y funcional para mantener la motilidad, esta característica es uno de los puntos importantes de la evaluación seminal ya que depende del cuidado que se le dé a la muestra, evitando contacto con el calor y el frío. Los aspectos a considerar es el porcentaje de espermatozoides en movimiento que va de 70 a 90%, la motilidad progresiva, la velocidad espermática y la longevidad de la motilidad espermática en semen puro y diluido, estos movimientos pueden ser observados mediante una evaluación del movimiento masal y movimiento individual (Hafez, 2002). Por otro lado, el potencial de la membrana mitocondrial se reduce luego del proceso de criopreservación siendo un indicador directo de la motilidad e indirecto de la capacidad fecundante (Allauca et al., 2019).

3 Materiales y Métodos.

El presente estudio se ejecutó dentro del laboratorio de reproducción de la Universidad Católica de Cuenca, en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, situada en la provincia del Azuay, en el Cantón Cuenca, localizada en el kilómetro 2½ de la Panamericana Norte la cual inicio en el mes de febrero, teniendo una duración aproximadamente de 8 meses donde se llevó a cabo el tema “Efecto de la concentración de la menaquinona-4 sobre el semen de ovino en refrigeración” para esto se utilizó tres razas de ovinos donantes, entre estos el Pelibuey, Dorper y Katahdin de los cuales se recolectaron 5 eyaculados de cada uno teniendo un total 15 muestras a las cuales se aplicó las dos dosis de control previamente establecidas (1mM y 10 mM) y se evaluaron durante las 0, 24 y 48 hora, incluyendo el testigo (semen puro).

3.1 Proceso de campo

Para el proceso de campo donde se dio la recolecta de la muestra se utilizó una vagina artificial (*inv technologies*) a la cual se le añadió de 40 – 60 ml de agua, a una temperatura de 40 a 45 °C debido al tiempo que transcurre desde la salida del laboratorio hasta la recolecta, de esta manera llegando a una temperatura de 37 °C a la hora de la monta, esto se le sumo al agregado del aire en la cámara de agua para estrechar la luz vaginal 1 cm de diámetro, seguidamente se colocó un tubo Falcón de 5 ml estéril y rotulado en la parte de salida o cuello de la vagina.

Para la monta se utilizó una borrega que provocó el reflejo de Flehmen en el macho, posteriormente se dio la monta. Para la recolecta el operador se colocó en la parte derecha de los animales sosteniendo la vagina con su mano derecha y con el extremo abierto frente al prepucio, en un ángulo de 45° con respecto al piso. Se obtuvo el “golpe de riñón” del animal hacia arriba y hacia adelante indicando el momento de la eyaculación. Se procedió a protegerla muestra que está en el tubo Falcón para evitar cambios bruscos de temperatura y entrada de la luz, colocando a temperatura corporal de 37°C de este modo se llevó la muestra al laboratorio y se colocó a baño María a 37 °C.

3.2 *Proceso de laboratorio*

3.2.1 *Motilidad*

Se empezó colocando una gota de 5 µl de semen puro en un portaobjeto previamente calentado en la platina térmica junto a los cubre objetos. Para la evaluación microscópica de la motilidad masal (MM) se utilizó un lente de 10x (Figura 1), mientras que con ayuda de un lente de 40x se observó la motilidad individual (MI), (Figura 2), las cuales deben ser superiores al 80% de motilidad, las puntuaciones se colocaron en un rango del 1 al 5 donde 1 representa el 24% y 5 el 100% de espermaticidas móviles, de esta manera aceptando o descartando la muestra seminal ya que incluye un parámetro importante en la evaluación de calidad.



Figura 1. Motilidad Masal

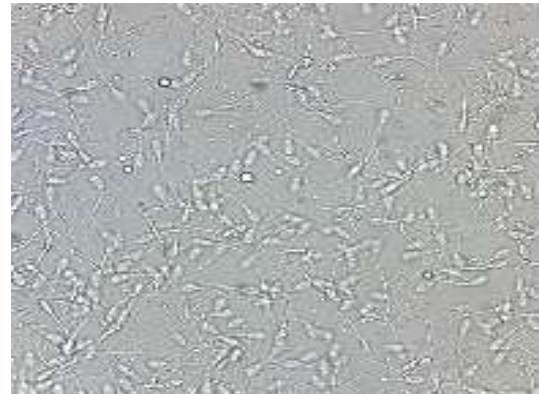


Figura 2. Motilidad Individual

3.2.2 *Concentración Espermática*

La concentración espermática se observó con ayuda de un fotómetro SMD especializado para ovinos, en el que se colocó 30 µl de semen puro en una microcubeta evitando la presencia de burbujas que puedan variar los resultados de la concentración seminal.

3.2.3 *Pre-disolución*

Este proceso se realizó rápidamente después de las evaluaciones de motilidad y la observación de la concentración, teniendo en cuenta que la muestra no puede permanecer por largos periodos de tiempo en baño María a 37 °C ya que puede variar su motilidad, es por eso que se realizó una pre-disolución con relación 1:1 (1 parte del volumen total de la muestra obtenida de semen puro y 1 parte del mismo volumen del diluyente, yema de huevo y agua

pura, este último con relación 1:1:3 dependiendo el volumen seminal a diluir), de esta manera se extendió el periodo de tiempo de la muestra dentro del baño María.

3.2.4 *Solución Madre*

Mientras se tuvo la pre-disolución en baño María se calculó la solución madre, esta se obtuvo mediante una multiplicación del volumen total de semen en ml x la concentración seminal x motilidad masal (MM) x motilidad individual (MI), estos dos últimos datos nos manejamos con el 80% en todas las muestras.

El valor obtenido se dividió para la concentración deseada en la pajuela, en este caso se manejó con 50 millones, el total de este resultado indico el N° de pajuelas a trabajar, seguidamente el N° de pajuelas obtenidas se dividió para 4 ya que es el número de pajuelas en las que almacenamos (0.25 cc), la obtención de esta división indicó el volumen de la solución madre en ml.

Cabe destacar que en la solución madre obtenida se realizó una resta de la cantidad de pre-disolución ya que esta se aplicó con anterioridad. Por último, se calculó una la relación 1:1:3 (Triladyl®, Yema de huevo y Agua Pura) de la solución obtenida y se mezcló en un tubo Falcón de 50 ml, cabe destacar que los componentes para hacer la relación de Triladyl® tuvieron que permanecer previamente en baño María en tubos Falcón de 15 ml para que no se produzca un choque térmico con la muestra pre- diluida, la cual se mezcló por último con la solución madre obtenida.

3.2.5 *Adición de Manaquinona-4*

En este punto la manaquinona-4 fue disuelta junto con DMA (*dimetilacetamida*) obteniendo las dosis correspondientes de 1 mM y 10 mM, colocando cada una en distintos tubos Eppendorf rotulados, estas muestras se ocuparon a lo largo de la investigación conservadas a -19°C las cuales se descongelaban en la platina térmica a 37°C para cada evolución. Para la mezcla con la muestra, se colocaba 1 ml de solución madre en tubos Falcón y se agregaba 10 µl de cada dosis ya previamente descongelada en los tubos correspondientes tratado de homogeneizar los dos compuestos, esto se realizó con las muestras en el baño María.

3.2.6 *Empajuélalo*

Para el empajuélalo se requirió saber el número total de pajuelas, el cual se obtuvo con anterioridad, estas pajuelas fueron debidamente rotuladas con el nombre del animal, numero de repetición y fecha. Posteriormente se sacaron los tubos de la solución con vitamina y el testigo del baño María y se empajuelo.

3.2.7 *Estabilización de las Muestras*

En el proceso de estabilización se ubicaron las pajuelas dentro de la refrigeradora a 5 °C durante 2 horas para que se sometan a un enfriamiento gradual, con la finalidad de prevenir cambios bruscos de temperatura.

3.3 Evaluación es complementarias

Todas las pruebas fueron realizadas y analizadas cada 0; 24 y 48 horas después de la refrigeración incluyendo los testigos y las dos dosis de manquinona-4 (1mM y 10Mm).

3.3.1 Análisis del sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis)

Para el análisis de las muestras se utilizó el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) (Figurara 3). Para este proceso se agregó en un portaobjeto una gota de 5 μ l de la muestra del testigo y por otra parte también una gota de cada dosis de menaquinona-4, observando diversos parámetros espermáticos entre estos, los espermatozoides progresivos (PR), no progresivos (NP), inmóviles (IM), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), velocidad lineal (VSL), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), amplitud lateral de la cabeza (BCF) y frecuencia de batida (BCF).

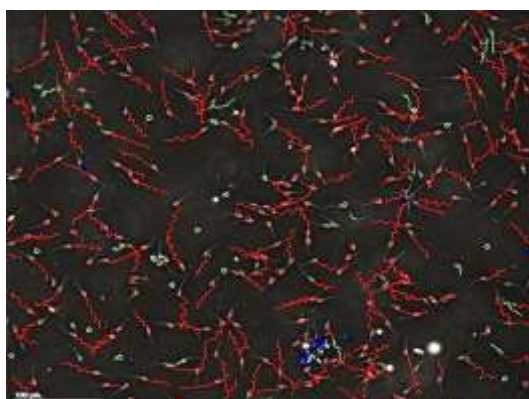


Figura 3. Sistema CASA

3.3.2 Análisis de la viabilidad espermática

3.3.2.1 Prueba de Eosina-Nigrosina

Para esta evaluación se utilizó el método tradicional, se comenzó colocando en un extremo de un portaobjeto 3 μ l de Eosina-Nigrosina junto con 3 μ l de la muestra espermática, seguidamente con ayuda de otro portaobjeto se mezcló suavemente y realizamos un barrido hacia el otro extremo de la placa dejando reposar aproximadamente 2 min. Para la observación de la muestra en el microscopio se utilizó un aumento de 40x, observando distintos campos de la muestra hasta llegar a contar 100 espermatozoides tanto vivos como muertos, de esta manera se determinó el porcentaje de vitalidad.

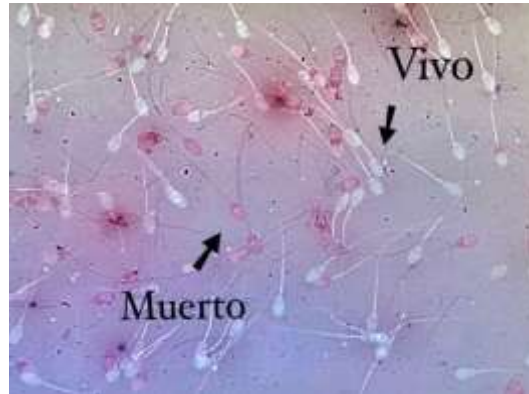


Figura 4. Tinción de Eosina-Nigrosina

3.3.2.2 Prueba de Yoduro de Propidio

El proceso se desarrolló utilizando un tubo Eppendorf de 1,5 ml donde se vertió 3 μ l de Yoduro de Propidio junto a 50 μ l de la muestra seminal dejándole reposar durante 15 minutos en la platina térmica para posteriormente llevar la muestra fuera del alcance de la luz, se realizó u respectivo frotis y evaluación, esta muestra se evaluó con ayuda de un microscopio de fluorescencia con un lente de 40x y con el filtro número 1, de esta manera recolectando datos de 100 espermatozoides de diferentes campos entre teñidos que representan un color rojo fosforescente (muertos) y no pintados (vivos) con el ADN intacto.

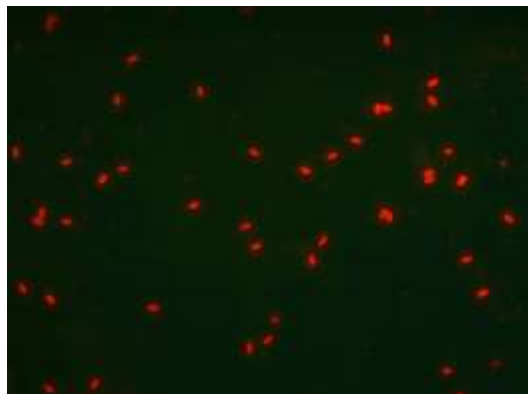


Figura 5. Tinción de Yoduro de Propidio

3.3.3 Integridad funcional de la membrana

En esta etapa se utilizó 100 μ l de la solución de Host acompañada de 20 μ l de la muestra en un tubo Eppendorf donde se homogenizo y permaneció en la platina térmica a 37 °C, durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se procedió a evaluar la muestra colocando una gota de 5 μ l sobre un porta objetos y se colocó el cubre objetos para valorar la muestra en el microscopio (Olympus BX51) con el lente de 40x llegando analizar 100 espermatozoides, los cuales mostraron ser positivos y negativos a la solución de Host es decir a la funcionalidad de la membrana plasmática

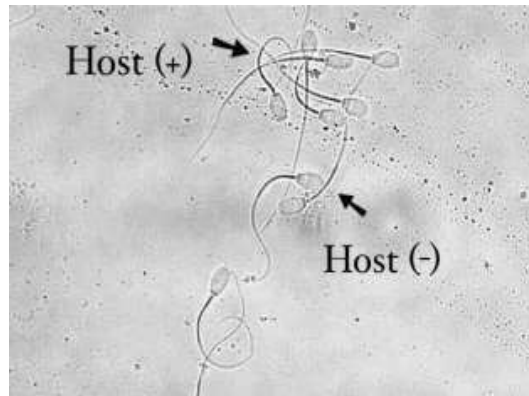


Figura 6: Prueba de Host

3.3.4 Integridad y Potencial de la Membrana Mitocondrial

El análisis se dio mediante la utilización de la tinción de Rodamina en la cual los espermatozoides teñidos de color verde fosforescente indican una buena funcionalidad, esto se realizó depositando 3 μ l de Rodamina en 50 μ l de la muestra, en un reposo de 37 °C por un periodo de 10 minutos, se colocó una gota de 5 μ l en el portaobjeto y se evaluó en un microscopio de fluorescencia con el filtro 3. Finalmente se siguió el mismo procedimiento base de conteo.

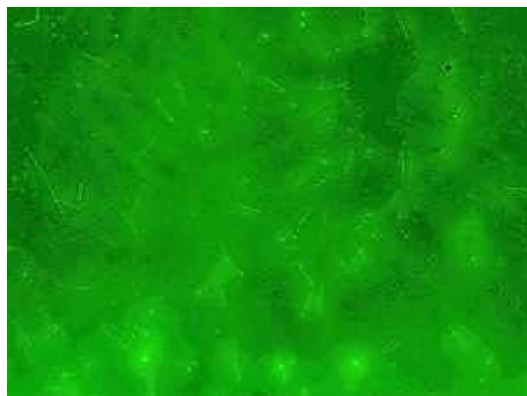


Figura 7. Tinción de Rodamina.

3.4 Análisis Estadístico

Para el análisis de las diferencias estadísticas en los parámetros de calidad espermática entre razas se realizó un ANOVA de una entrada a partir de un diseño completamente al azar (DCA), mientras que los tratamientos de dosis bloqueados a partir de horas se analizaron con un ANOVA de dos entradas y basados en un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), evaluando así las variables dependientes como la viabilidad, integridad de la membrana y función mitocondrial a través de las pruebas (Host, Eosina-nigrosina, Yoduro de Propidio y Rodamida), así como las variables de progresividad que analiza el sistema CASA.

4 Resultados.

Tabla 1. Interpretación del análisis de varianza entre razas.

En la evaluación de semen refrigerado se utilizó el análisis de varianza entre raza, el cual se ejecutaron pruebas de permeabilidad espermática (viabilidad), progresividad y velocidad. En la prueba de Eosina-Nigrosina la raza Pelibuey es la de mayor valor con (29,58% ± -21,04) mostrando tener una superior vitalidad en comparación a las razas Dorper y Kathadin.

Por otro lado, la variable de Yoduro de Propidio, presentó mayor valor en la raza Pelibuey con un valor de (33,90% ± -21,65) lo que significa que tiene mayor apoptosis que las otras razas.

La raza Kathadin en la variable Rodamida tiene mayor porcentaje acrosomal que Pelibuey y Dorper con (34,40% ± -1780).

En cuanto a la progresividad de las razas analizadas, Dorper tiene una mayor movilidad progresiva con (65,18% ± -31,67) a comparación de las otras razas. Por otro la raza Kathadin mostro mayor porcentaje de movilidad no progresiva con (41,41% ± -24,99) a comparación de la raza Pelibuey y Dorper.

Los valores de inmóviles están al límite de significancia ($p \approx 0.05$), presentaron menor porcentaje en la raza Dorper (2,99% ± -4,79) mientras que la Pelibuey presentó (7,33% ± -13,98) y Kathadin (5,90% ± -12,19), en este caso no se observó mayor diferencia.

De acuerdo con el análisis de estas variables, se pudo observar que la raza Dorper resalta por su alta movilidad progresiva, mientras que la raza Pelibuey por su vitalidad y la Kathadin por su alta integridad de la membrana espermática.

VARIABLES	PELIBUEY	DORPER	KATHADIN	Valor p
HOST (%)	(35,34± -15,49) ^{ab}	(33,04±-13,90) ^a	(37,96±-19,29) ^b	0,096
EOSINA (%)	(29,58±-21,04) ^b	(25,58±-17,51) ^a	(25,32±-15,61) ^a	0,037*
YODURO (%)	(33,90±-21,65) ^b	(29,32±-19,74) ^a	(28,49±-18,71) ^a	0,001*
RODAMIDA (%)	(27,60±-18,78) ^a	(30,34±-18,88) ^{ab}	(34,40±-17,80) ^b	0,007*
PROGRESIVOS (%)	(56,42±-28,20) ^a	(65,18±-31,67) ^b	(52,71±-27,49) ^a	0,001*
NO PROGRESIVOS (%)	(34,95±-24,49) ^a	(31,93±-30,31) ^a	(41,41±-24,99) ^b	0,001*
INMOVILES (%)	(7,33±-13,98) ^b	(2,99±-4,79) ^a	(5,90±-12,19) ^{ab}	0,050*
VELOCIDAD CURVILINEA ($\mu\text{m/s}$)	(82,20±-34,35) ^a	(89,27±-38,43) ^a	(95,56±-36,74) ^a	0,141
VELOCIDAD MEDIA ($\mu\text{m/s}$)	(48,71±-18,62) ^a	(50,95±-20,87) ^{ab}	(56,54±-20,55) ^b	0,096
VELOCIDAD LINEAL ($\mu\text{m/s}$)	(32,43±-12,65) ^a	(34,43±-15,48) ^a	(37,13±-13,19) ^a	0,225
INDICE DE RECTITUD (%)	(63,59±-9,60) ^a	(61,42±-11,07) ^a	(62,65±-7,70) ^a	0,494
INDICE DE LINEALIDAD (%)	(39,28±-11,32) ^a	(37,02±-9,68) ^a	(37,17±-9,42) ^a	0,453
AMPLITUD DE LA CABEZA (μm)	(2,22±-0,80) ^a	(2,32±-0,84) ^a	(2,47±-0,81) ^a	0,256
FRECUENCIA DE BATIDA DE COLA (Hz)	(11,88±-9,39) ^a	(11,52±-4,09) ^a	(11,16±-3,95) ^a	0,848

*Valores Inferiores o iguales a 0,05 presentan diferencias estadística

Tabla 2. Evaluación Comparativa de varianza entre las dosis 1 mM y 10 Mm de menaquinona-4.

Este análisis se manejó con dos tratamientos de manequinona-4 (1 Mm y 10 mM), donde se observó que las variables con diferencias significativas son Host, Eosina-Nigrosina, Yoduro de Propidio, Rodamida, PR, NP, STR y ALF con $p \approx 0.0001$, IM mostró $p \approx 0.002$, VCL con $p \approx 0.004$, LIN $p \approx 0.032$ y VAP con $p \approx 0.047$ en términos relativos, las variables de vitalidad, funcionalidad de la membrana, relación mitocondrial, apoptosis, movilidad y la relación acrosomal muestran cambios significativos, mientras que el testigo es mayor a los tratamientos en la variable de NP con $(62,09\% \pm -20,35)$.

Las variables espermáticas son mayores en los intervalos de los tratamientos en comparación al testigo, aunque la dosis 1 mM muestra 12 variables superiores frente a la dosis 10 mM con 2 valores numéricos.

VARIABLES	1	10	Testigo	Valor p
HOST (%)	(38,91±12,03) ^b	(42,58±15,90) ^b	(27,50±16,44) ^a	0,0001*
EOSINA (%)	(37,36±15,63) ^c	(33,16±15,82) ^b	(14,18±13,71) ^a	0,0001*
YODURO (%)	(43,76±12,50) ^b	(43,09±12,94) ^b	(11,29±12,12) ^a	0,0001*
RODAMIDA (%)	(41,71±13,18) ^b	(40,91±13,92) ^b	(14,98±13,21) ^a	0,0001*
PROGRESIVOS (%)	(75,88±16,11) ^b	(80,13±16,10) ^b	(28,25±16,92) ^a	0,0001*
NO PROGRESIVOS (%)	(20,61±13,10) ^a	(16,92±13,03) ^a	(62,09±20,35) ^b	0,0001*
INMOVILES (%)	(3,34±7,01) ^a	(3,26±5,31) ^a	(8,57±15,44) ^b	0,002*
VELOCIDAD CURVILINEA ($\mu\text{m/s}$)	(82,09±34,46) ^a	(80,80±33,14) ^a	(100,35±38,47) ^b	0,004*
VELOCIDAD MEDIA ($\mu\text{m/s}$)	(49,51±19,32) ^b	(48,49±19,00) ^a	(56,67±21,08) ^b	0,047*
VELOCIDAD LINEAL ($\mu\text{m/s}$)	(35,07±14,93) ^a	(33,86±14,35) ^a	(34,96±12,87) ^a	0,893
INDICE DE RECTITUD (%)	(65,54±7,95) ^b	(64,05±12,33) ^b	(59,20±7,00) ^a	0,001*
INDICE DE LINEALIDAD (%)	(40,25±9,93) ^b	(38,85±12,26) ^{ab}	(35,24±7,94) ^a	0,032*
AMPLITUD DE LA CABEZA (μm)	(2,19±0,71) ^a	(2,12±0,72) ^a	(2,62±0,89) ^b	0,001*
FRECUENCIA DE BATIDA DE COLA (Hz)	(12,82±9,68) ^a	(10,40±3,73) ^a	(46,33±18,12) ^a	0,153

Valores* Inferiores o iguales a 0,05 presentan diferencias estadísticas

Tabla 3. Intervalos de Evaluación

Esta tabla evaluó el comportamiento de las variables frente a las horas de análisis, los resultados presentaron una disminución según el tiempo transcurrido en un intervalo de 0 a 48 horas, las variables que presentaron esta reducción fueron Host, con el grupo testigo de menor valor con $(27,13\% \pm -23,29)$ y Rodamina, de la misma manera, con un valor superior al grupo testigo que presentó $(9,53\% \pm -8,81)$, todas estas variables mostraron una significancia del $p \approx 0.0001$. En cambio, el grupo avaluado por el sistema CASA (PR; VCL; VAP; VSL y ALH) mostraron significancia, pero con distintos valores p.

Entre las variables significativas que tuvieron un aumento con el tiempo esta, Eosina-Nigrosina, Yoduro de Propidio y los IM, los cuales muestran significancia de $p \approx 0.0001$. Por otro lado, entre las variables no significativas están los NP con $p \approx 0.603$ presentado en el testigo de mayor valor con $(60,10\% \pm -17,45)$ en contraste con las horas, dentro de este grupo también se encuentra STR, LIN y BCF. Las variables analizadas en diferentes intervalos de tiempo son esenciales para la toma de decisiones en programas de conservación y reproducción.

VARIABLES	0 horas	24 horas	48 horas	Testigo	Valor p	Dosis x Hora
HOST (%)	(42,60±17,60) ^c	(36,00±13,68) ^b	(30,51±11,82) ^{ab}	(27,13±23,29) ^a	0,0001	0,0002
EOSINA (%)	(19,18±13,76) ^a	(27,49±16,93) ^b	(37,84±18,83) ^c	(14,73±13,03) ^a	0,0001	0,04
YODURO (%)	(23,80±14,94) ^a	(31,70±19,29) ^b	(39,78±21,85) ^c	(19,87±19,34) ^a	0,0001	0,0001
RODAMIDA (%)	(38,87±22,19) ^c	(33,76±15,17) ^c	(26,80±13,24) ^b	(9,53±8,81) ^a	0,0001	0,0001
PROGRESIVOS (%)	(65,43±30,12) ^b	(61,66±28,55) ^b	(59,45±25,45) ^b	(21,41±11,06) ^a	0,019	0,516
NO PROGRESIVOS (%)	(31,63±28,35) ^a	(34,03±27,06) ^a	(34,63±24,14) ^a	(60,10±17,45) ^b	0,603	0,551
INMOVILES (%)	(3,24±10,88) ^a	(2,62±6,81) ^a	(6,00±8,20) ^a	(18,49±19,11) ^b	0,0001	0,479
VELOCIDAD CURVILINEA (μm/s)	(100,32±41,33) ^a	(84,32±31,45) ^a	(82,94±35,86) ^a	(87,33±34,92) ^a	0,018	0,518
VELOCIDAD MEDIA (μm/s)	(58,51±21,99) ^b	(49,96±17,91) ^{ab}	(49,14±19,79) ^{ab}	(47,82±19,48) ^a	0,011	0,498
VELOCIDAD LINEAL (μm/s)	(40,47±15,67) ^b	(32,40±11,07) ^a	(32,88±13,49) ^a	(29,40±12,42) ^a	0,005	0,646
INDICE DE RECTITUD (%)	(64,00±10,01) ^b	(62,09±8,75) ^b	(63,64±10,45) ^b	(56,37±4,04) ^a	0,392	0,566
INDICE DE LINEALIDAD (%)	(39,80±9,87) ^b	(37,20±8,23) ^{ab}	(38,27±12,76) ^b	(32,45±4,73) ^a	0,38	0,975
AMPLITUD DE LA CABEZA (μm)	(2,54±0,93) ^a	(2,28±0,73) ^a	(2,21±0,79) ^a	(2,27±0,76) ^a	0,035	0,672
FRECUENCIA DE BATIDA DE COLA (Hz)	(12,75±3,61) ^b	(11,39±3,28) ^{ab}	(11,42±10,12) ^{ab}	(8,53±3,34) ^a	0,38	0,406

Valores* Inferiores o iguales a 0,05 presentan diferencias estadísticas

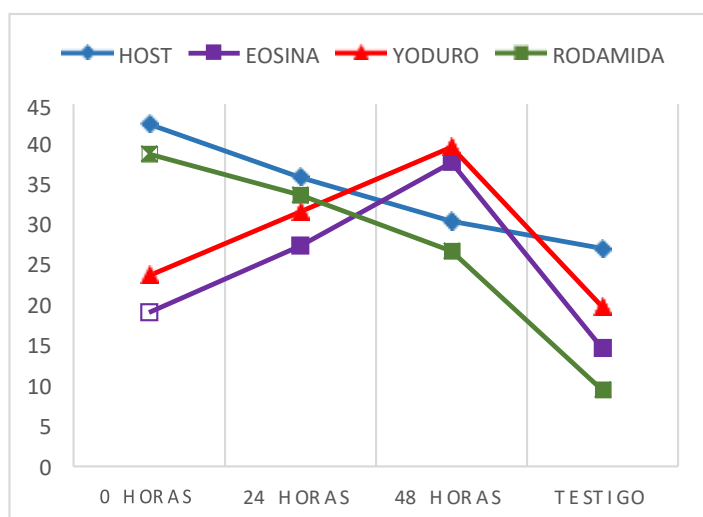


Figura 8. Efecto de las Pruebas por horas en las razas

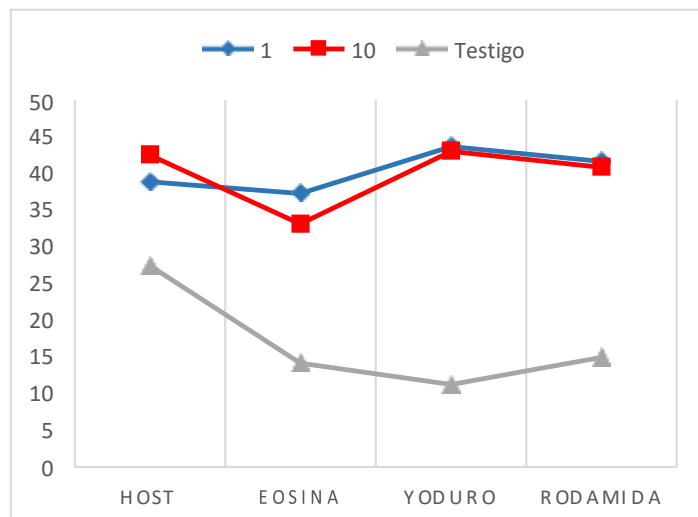


Figura 9. Impacto de MK-4 en pruebas

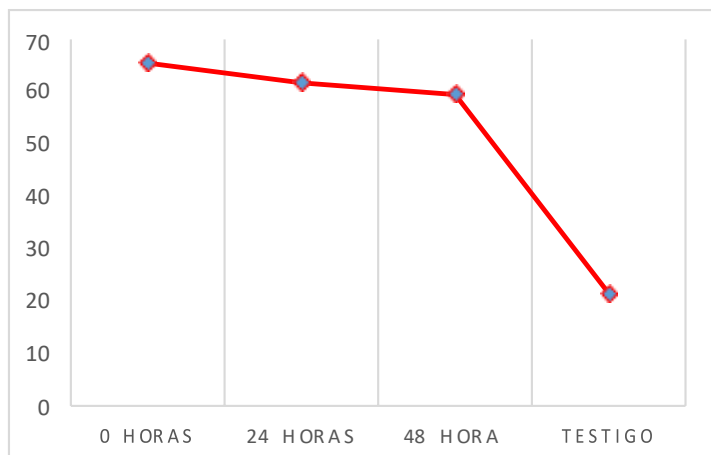


Figura 10. Progresividad según las horas

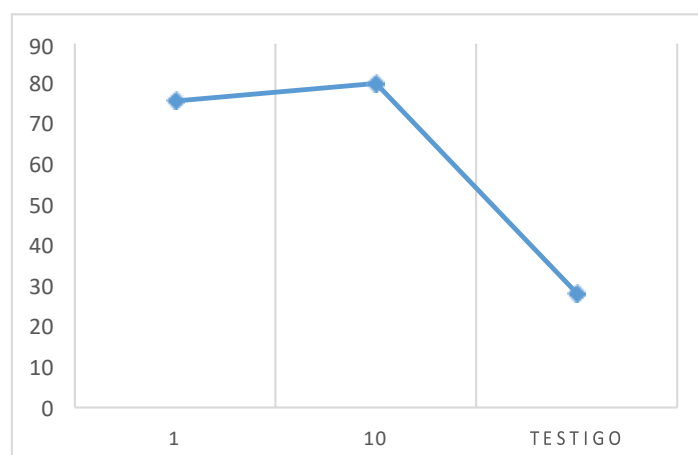


Figura 11. Progresividad con MK-4

En la **(Figura 8)** se mostró cómo actúan las pruebas de Host, Eosina-Nigrosina, Yoduro de Propidio y Rodamida con respecto al transcurso de las horas, en cuanto a la solución Host (línea azul) comenzó con un valor elevado de 42.6% a las 0h pero va disminuyendo a medida que transcurre el tiempo llegando en 24h a 36% y a las 48h a 30.51%, hasta finalmente llegar a 27.13% que es el testigo o control, esto se debe al deterioro y reducción de su capacidad para enrollar flagelo e hincharse en una solución hipoosmótica. La Rodamida (línea verde) también presentó descendencia gradual en sus valores, comenzando con 33.76% a las 0h, 33.76% en las 24h, 26.8% en 48h y termina en el testigo con 9.53% indicando una reducción en la actividad mitocondrial.

Por otro lado, en la tinción de Eosina-Nigrosina (línea morada) se observó lo contrario que en la prueba de Host y Rodamina, esta empezó con valores inferiores de 19.18% a las 0h, pero va incrementando llegando a 27.49% a las 24h y finalmente a su punto más alto de 37.84% a las 48h, sin embargo, el grupo de control se mantiene en 14.73%, los valores van descendiendo debido a que la viabilidad espermática se fue desgastando y de esta manera tiñendo cada vez más espermatozoides muertos. En cuanto a la tinción de Yoduro de Propidio (línea roja) sucede lo mismo, se observó que comenzó con 23.8% a las 0h; 31.7% en 24h y 39.78% en 48h, mientras que el testigo fue obtuvo 19.87%, demostrando que fue incrementando las células dañadas.

En las pruebas realizadas con el tratamiento de manaquinona-4 tanto para Host, Eosina-Nigrosina, Yoduro de Propidio y Rodamina **(Figura 9)** nos indicó que en la prueba de Host con dosis 1mM (línea azul) presenta 38.91% mientras que 10 mM (línea roja) es relativamente un poco superior con 42.58%, en Eosina la estadística continúa igual, 1 mM presenta 37.36% y los valores suben en la dosis 10 mM con 33.16%, en la prueba de Yoduro de Propidio los valores son casi similares, pero aumentó a con 43.76% en la dosis de 10 mM y 10 mM mostro 43.09%, para la prueba de Rodamida la dosis 1 mM aumento, mostrando 41.71% y 10 mM 40.91%, cabe destacar que todos estos valores mencionados fueron significativamente más altos que los valores del testigo. Ambas dosis muestran resultados similares en valores estadísticos, pero el tratamiento con 1 mM es más representativo.

La progresividad es uno de los puntos primordiales de la investigación, en esta grafica **(Figura 10)** se muestra según las horas transcurridas donde presentó una tendencia decreciente de esta variable, mostrando a las 0h un valor superior al resto con 65.43%, a las 24h de 61.66% y a las 48h de 59.45%, esto debido a un desgaste de su movilidad y funcionalidad en el transcurso de las horas siendo el valor más bajo el testigo con 21.4%, resaltando las dosis del tratamiento.

Respecto a la progresividad basada en los tratamientos **(Figura 11)** se demostró que la dosis con mayor valor es 10 mM con 80.13% a comparación de 1mM que obtuvo un valor de 75.8% aun así, ambas dosis demuestran un valor de progresividad elevado, mientras tanto el testigo alcanza una progresividad considerablemente baja de 28.25%.

5 Discusión.

La investigación realizada demuestra la importancia de los resultados obtenidos relacionados con el uso de tratamientos con MK-4, también llamada Vitamina K₂, en la conservación espermática, la cual se relaciona como un antioxidante y agente antiinflamatorio inactivando las especies reactivas, reduciendo la acumulación de radicales libres y favoreciendo la protección contra el daño oxidativo, esto mediante la inhibición de activación de 12-lipoxigenasa y su actividad como factor GGCX (*gamma-glutamyl carboxylase*) como indica Popa et al., (2021).

Dentro de este marco, los resultados de este estudio demostraron ser positivos en MK-4 para los procesos de conservación espermática en el semen de ovino refrigerado a lo largo del tiempo con dosis de 1mM y 10 mM, ambas dosis resultaron favorables al ser bastante similares con pequeñas variaciones, 1 mM mostró mejores resultados en la gran parte de pruebas, no obstante, en ciertos casos el tratamiento con 10 mM resultó ser superior a la dosis de 1 mM en las pruebas de Host y progresividad, sin embargo las pruebas aplicadas tuvieron una significancia de $p = 0.0001$, en su mayoría a excepción de las pruebas de velocidad lineal y frecuencia de batida de cola, si comparamos frente al testigo, este presenta valores inferiores.

En consecuencia, los resultados presentados pueden variar debido a la osmolaridad, ya que el estudio de Pereira et al., (2017) indica que, cuando los espermatozoides se someten a entornos hipo o hipertónicos, presentando un agrandamiento de la cabeza y enroscando la cola debido a que el espermatozoide intenta de recuperar agua, para mantener el equilibrio. El tratamiento a 10 mM presentó mayor valor en la prueba de Host debido a su concentración más alta según lo mencionado y por ende el espermatozoide se sometió a capacidades reguladoras del volumen en respuesta al desafío hipertónico. Además, para este proceso depende de varios factores como el tiempo transcurrido tras el eyaculado y características individuales de cada animal, el semen en conservación líquida también puede aumentar la osmolaridad debido a que está sometido a factores que influyen en la actividad enzimática y secreción prostática, recurriendo a la aplicación de antioxidantes para prolongar su tiempo (Cheng et al., 2022).

La investigación fue respaldada por un estudio realizado por Hakim & Mohammed (2023) sin embargo, aunque no hablan específicamente del uso de vitamina K₂ se relaciona con la vitamina D₃ en semen refrigerado de ovino Awassi evaluado a las 0h y 72h diluidos en Tris-yema de huevo, con dosis de 0,02; 0,004; 0,002 mg/ml demostrando un aumento en los parámetros antioxidantes como la capacidad antioxidante total (TAC) y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) esta última ayuda a reducir los radicales libres y el estrés oxidativo. Por otro lado, un estudio reveló que la vitamina E a dosis de 3 mM en semen de macho ayudó a la conservación hasta las 72h con una viabilidad e integridad funcional mayor (Sarangi et al., 2017).

En cuanto a los estudios relacionados directamente en vitamina K₂ sobre el semen son totalmente escasos, no obstante, se realizó una investigación sobre el uso de vitamina K₂ en embriones de ovinos donde se demostró que la suplementación del medio de cultivo in vitro antes y después de la vitrificación, con vitamina K₂ reduce significativamente la producción de ROS y mejora la expresión génica embrionaria, lo que tiene un efecto beneficioso sobre la

calidad de los blastocitos producidos in vitro y mejora la crio-supervivencia y la tasa de eclosión del embrión después de la vitrificación (Sefid et al., 2017). Asimismo, investigaciones adicionales señalan que la vitamina K₂ puede ayudar a la función mitocondrial en las células (Baldocea-Baldeon et al., 2014).

Los resultados frente al testigo presentan una gran variación por el antioxidante empleado, mejorando las células del daño oxidativo, aunque otro parámetro importante es el estado de almacenamiento de la muestra como la refrigeración, el estudio de Silvestre et al., (2021) indica que el semen bajo refrigeración no detiene por completo el metabolismo espermático lo que implica que la dosis de 10 mM pudo haber estimulado más con mayor eficacia las vías metabólicas involucradas en la producción de energía a través de moléculas de ATP ya que presenta una concentración más alta y de esta manera haber aumentado su capacidad progresiva ligeramente, además aplicando la técnica de conservación en refrigeración tiene mayor tiempo de vida los espermatozoides en el tracto femenino reproductivo de la hembra a comparación del semen congelado, teniendo un impacto positivo a la hora de las prácticas de IA post-cervical en ovinos debido a que presentan un cérvix intrincado.

Asimismo, otro estudio de Câmara et al., (2011) demuestra que la refrigeración del semen de carnero evaluado por tiempos a 5 °C mostró una disminución del porcentaje de células con membrana plasmática intacta en un tiempo hasta de 30h. Incluso en la refrigeración a 4°C se observa una adecuada motilidad (Mocé et al., 2023).

Por otro lado, a lo largo del estudio se emplearon ovinos jóvenes de distintas edades en un rango de un año como la raza Dorper y dos años y medio como la Pelibuey y Kathadin. La investigación de (Abah et al., 2023) nos menciona que el semen en animales jóvenes tiene una motilidad espermática total y progresivamente mayor que los animales adultos aun que presentan una cinética espermática menor por su inmadurez. Un estudio de Hassan et al., (2009) realizó una evolución sobre las características del semen en carneros de 1 a 4 años de edad, donde se demostró la edad óptima para un semen de calidad es entre los tres a cuatro años de edad. Estas razones resaltan el impacto de la MK-4 para el manteniendo de parámetros de motilidad y vitalidad.

6 Conclusiones.

El empleo de menaquinona-4 como antioxidante evidencia ser ventajoso para la criopreservación en el semen de ovino refrigerado reduciendo el estrés oxidativo.

Con referencia al análisis de los tratamientos con menaquinona-4, la dosis 10 mM presentó el valor más alto en los NP y en la prueba de Host manteniendo la viabilidad, mientras que la dosis 1 mM lo supera en las pruebas de Rodamina, Eosina y Yoduro, actuando en la integridad acrosomal. En las velocidades se demostró que en la VCL y VAP del grupo testigo es más eficaz, no obstante, la VSL y los espermatozoides PR fueron más alta para la dosis de 1 mM, por último, la ALH y BCF fue más elevado en el testigo. De acuerdo con lo expuesto la dosis de 1mM es la más adecuada y eficiente para la conservación espermática, debido a que presenta una integridad acrosomal, movilidad progresiva y no presentó gran diferencia en la progresividad.

Finalmente, en las horas evaluadas, las pruebas de Host, Rodamida, PR, VCL, VAP, VSL, STR, ALH y BCF fueron disminuyendo con el transcurso del tiempo mientras que Eosina, Yoduro, NP, IM y LIN fueron aumentando con el transcurso del tiempo, indicándonos que la viabilidad y movilidad van disminuyendo y las variables que disminuyen indican movilidad incapaz y daño celular.

Aunque el estudio ha demostrado con éxito, el manejo de menaquinona-4 tiene ciertas limitaciones como la falta de información, surgiendo una serie de cuestiones que serían interesantes de resolver para futuras investigaciones, como el manejo de vitamina K₂ con dosis menores y por tiempos más prolongados en refrigeración, aun así, la presente investigación contribuye al conocimiento existente en la criopreservación, ofreciendo beneficios significativos en los parámetros espermáticos y abriendo nuevos caminos para la reproducción animal.

7 Bibliografía.

- Abah, K. O., Fontbonne, A., Partyka, A., & Nizanski, W. (2023). Effect of male age on semen quality in domestic animals: Potential for advanced functional and translational research? *Veterinary Research Communications*, 47(3), 1125-1137. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10159-1>
- Abdel-Aziz Swelum, A., M Saadeldin, I., Ba-Awadh, H., G Al-Mutary, M., F Moumen, A., N Alowaimer, A., & Abdalla, H. (2019). Efficiency of Commercial Egg Yolk-Free and Egg Yolk-Supplemented Tris-Based Extenders for Dromedary Camel Semen Cryopreservation. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 9(11), 999. <https://doi.org/10.3390/ani9110999>
- Aguilar-Martínez, C. U., Espinoza Gutiérrez, B., Segura Correa, J. C., Berruecos Villalobos, J. M., Valencia Méndez, J., Roldán Roldán, A., Aguilar Martínez, C. U., Espinoza Gutiérrez, B., Segura Correa, J. C., Berruecos Villalobos, J. M., Valencia Méndez, J., & Roldán Roldán, A. (2021). Caracterización genética de la oveja Pelibuey de México usando marcadores microsatélites. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(1), 36-57. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i1.5106>
- Akbulut, A. C., Pavlic, A., Petsophonsakul, P., Halder, M., Maresz, K., Kramann, R., & Schurgers, L. (2020). Vitamin K2 Needs an RDI Separate from Vitamin K1. *Nutrients*, 12(6), 1852. <https://doi.org/10.3390/nu12061852>
- Allauca, P., Ugarelli, A., & Santiani, A. (2019). Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 288-298. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15677>
- Ávalos-Rodríguez, A., Gonzales Santos, J. A., Vargas Ibarra, A. K., & Herrera Barragán, J. A. (2018). *Recolección y manipulación seminal* (Universidad Autónoma Metropolitana, 1-1). https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf
- Bai, H., Hiura, H., Obara, Y., Kawahara, M., & Takahashi, M. (2020). Short communication: Menaquinone-4 (vitamin K2) induces proliferation responses in bovine peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7531-7534. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17987>

- Baldoceda-Baldeon, L. M., Gagné, D., Vigneault, C., Blondin, P., & Robert, C. (2014). Improvement of bovine in vitro embryo production by vitamin K2 supplementation. *REPRODUCTION*, *148*(5), 489-497. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0324>
- Boafo, G. F., Magar, K. T., Ekpo, M. D., Qian, W., Tan, S., & Chen, C. (2022). The Role of Cryoprotective Agents in Liposome Stabilization and Preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), 12487. <https://doi.org/10.3390/ijms232012487>
- Bonaldo, F., & Leroy, F. (2024). Review: Bacterially produced vitamin K2 and its potential to generate health benefits in humans. *Trends in Food Science & Technology*, *147*, 104461. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104461>
- Câmara, D. R., Mello-Pinto, M. M. C., Pinto, L. C., Brasil, O. O., Nunes, J. F., & Guerra, M. M. P. (2011). Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, *100*(1), 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.05.010>
- Cely, L. D., Jaramillo, C. X., & Fonseca, M. J. (2021). Efecto de dos diluyentes sobre la tasa de preñez por inseminación artificial laparoscopica en ovinos. *Revista veterinaria*, *32*(2), 221-224. <https://doi.org/10.30972/vet.3225747>
- Cheng, J., Zhang, X., Xu, D., Zhang, D., Zhang, Y., Song, Q., Li, X., Zhao, Y., Zhao, L., Li, W., Wang, J., Zhou, B., Lin, C., Yang, X., Zhai, R., Cui, P., Zeng, X., Huang, Y., Ma, Z., ... Wang, W. (2022). Relationship between rumen microbial differences and traits among Hu sheep, Tan sheep, and Dorper sheep. *Journal of Animal Science*, *100*(9), skac261. <https://doi.org/10.1093/jas/skac261>
- Crespilho, A. M., Nichi, M., Guasti, P. N., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Sá Filho, M. F., Maziero, R. R., Dell'aqua, J. A., & Papa, F. O. (2014). Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, *146*(3-4), 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.020>
- Díaz-Curiel, M. (2015). Acción de la vitamina K sobre la salud ósea. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, *7*(1), 33-38. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2015000100008>

- El-Seadawy, I. E., Kotp, M. S., El-Maaty, A. M. A., Fadl, A. M., El-Sherbiny, H. R., & Abdelnaby, E. A. (2022). The impact of varying doses of moringa leaf methanolic extract supplementation in the cryopreservation media on sperm quality, oxidants, and antioxidant capacity of frozen-thawed ram sperm. *Tropical Animal Health and Production*, 54(6), 344. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03344-y>
- Feijoo León, Á. D. (2018). *Valoración económica de la producción de ovinos Pelibuey y Black Belly y las perspectivas de su desarrollo en el mercado del cantón Pastaza*. [masterThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/9052>
- Garzón-Jarrín, R. A., Arellano-Yasaca, J. E., Silva-Déley, L. M., Chicaiza-Sánchez, L. A., Cueva Salazar, N. M., Garzón-Jarrín, R. A., Arellano-Yasaca, J. E., Silva-Déley, L. M., Chicaiza-Sánchez, L. A., & Cueva Salazar, N. M. (2024). Parámetros de bienestar animal. Un indicador de calidad del faenado de ovinos en una provincia del Ecuador. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 11(1), 23-31. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2024.110100023>
- Hafez, E. S. E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* ([4a ed. en español, traducción de la 7a ed. en inglés]). Interamericana/McGraw-Hill.
- Jiménez-Aguilar, E., Quezada-Casasola, A., Prieto-Caraveo, M., Orozco-Lucero, E., Itzá-Ortiz, M., Carrera-Chávez, J., Jiménez-Aguilar, E., Quezada-Casasola, A., Prieto-Caraveo, M., Orozco-Lucero, E., Itzá-Ortiz, M., & Carrera-Chávez, J. (2021). Evaluación de la adición de quercetina y vitamina E al medio de criopreservación de semen ovino sobre la fertilidad in vivo. *Abanico veterinario*, 11. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.36>
- Jonker, A., & Yu, P. (2016). The Role of Proanthocyanidins Complex in Structure and Nutrition Interaction in Alfalfa Forage. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms17050793>
- Kaltsas, A. (2023). Oxidative Stress and Male Infertility: The Protective Role of Antioxidants. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(10), 1769. <https://doi.org/10.3390/medicina59101769>
- Khosravizadeh, Z., Khodamoradi, K., Rashidi, Z., Jahromi, M., Shiri, E., Salehi, E., & Talebi, A. (2022). Sperm cryopreservation and DNA methylation: Possible implications for ART success and the health of offspring. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(8), 1815-1824. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02545-6>

- López, A., Regueiro, M., Castrillejo, A., & Pérez-Clariget, R. (2010). Morfología espermática en carneros: Efectos del plano nutricional y de la época del año. *Agrociencia Uruguay*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.31285/AGRO.14.811>
- Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F. D., Olguín-Arredondo, H. A., Molina-Ramírez, L., & Avendaño-Reyes, L. (2012). Ovejas Pelibuey sincronizadas con progestágenos y apareadas con machos de razas Dorper y Katahdin bajo condiciones estabuladas: Producción de la oveja y crecimiento de los corderos durante el período predestete. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(1), 29-37. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2012000100005>
- Manzanilla-Pech, C. I. V., Torres Vázquez, J. A., Borrayo Zepeda, A., Ríos Utrera, Á., Baeza Rodríguez, J. J., Martínez Velázquez, G., Vega Murillo, V. E., & Montañó Bermúdez, M. (2012). Estimación de parámetros genéticos para características de crecimiento en borregos Katahdin usando diferentes modelos. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(4), 487-500.
- Marcantonini, G., Bartolini, D., Zatini, L., Costa, S., Passerini, M., Rende, M., Luca, G., Basta, G., Murdolo, G., Calafiore, R., & Galli, F. (2022). Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(10), 3254. <https://doi.org/10.3390/molecules27103254>
- Marle-Köster, E., & Visser, C. (2018). Genetic Improvement in South African Livestock: Can Genomics Bridge the Gap Between the Developed and Developing Sectors? *Frontiers in Genetics*, 9, 331. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00331>
- Miclea, V., & Varo-Ghiuru, F. (2010). Freezing of Spermatozoa from Tigaie Rams Belonging to The Hill Ecotype. *Scientific Papers*.
- Mocé, M. L., Esteve, I. C., Gómez, E. A., Pérez-Fuentes, S., & Mocé, E. (2023). Microbial composition of goat buck's ejaculates is modified by the process of preparing and storing refrigerated semen doses. *Theriogenology*, 209, 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.013>
- Montossi, F., Font-i-Furnols, M., del Campo, M., San Julián, R., Brito, G., & Sañudo, C. (2013). Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat Science*, 95(4), 772-789. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.048>

- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., & Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 5-14. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
- Qiao, G., Xu, P., Guo, T., Wu, Y., Lu, X., Zhang, Q., He, X., Zhu, S., Zhao, H., Lei, Z., Sun, W., Yang, B., & Yue, Y. (2022). Genetic Basis of Dorper Sheep (*Ovis aries*) Revealed by Long-Read De Novo Genome Assembly. *Frontiers in Genetics*, 13, 846449. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.846449>
- Quishpi-Coronel, J. H. (2021). *Situación actual de la producción ovina en el Ecuador*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/16261>
- Reyes-González¹, E. A., Centurión-Castro², F., Uc-Espinosa³, N., Ek-Mex⁴, *, Peralta-Torres⁵, J. A., Segura-Correa², J. C., Reyes-González¹, E. A., Centurión-Castro², F., Uc-Espinosa³, N., Ek-Mex⁴, *, Peralta-Torres⁵, J. A., & Segura-Correa², J. C. (2022). Efecto de los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl y de dos tiempos de equilibrio en la congelación de semen de verraco. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(6). <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i6.22758>
- Rodríguez-Almeida, F. A., Ávila Cota, C. O., Anchondo Garay, A., Sánchez-Ramírez, B., & Jiménez Castro, J. A. (2008). Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*, 42(4), 399-406.
- Sarangi, A., Singh, P., Virmani, M., Yadav, A. S., Sahu, S., Ajithakumar, H. M., Kumari, A., & Rath, A. P. (2017). Effect of antioxidants supplementation on the quality of Beetal buck semen stored at 4°C. *Veterinary World*, 10(10), 1184-1188. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1184-1188>
- Sefid, F., Ostadhosseini, S., Hosseini, S. M., Ghazvini Zadegan, F., Pezhman, M., & Nasr Esfahani, M. H. (2017). Vitamin K2 improves developmental competency and cryo-tolerance of *in vitro* derived ovine blastocyst. *Cryobiology*, 77, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.06.001>
- Silvestre, M. A., Yániz, J. L., Peña, F. J., Santolaria, P., & Castelló-Ruiz, M. (2021). Role of Antioxidants in Cooled Liquid Storage of Mammal Spermatozoa. *Antioxidants*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antiox10071096>
- Simões, J., Abecia, J. A., Cannas, A., Delgado, J. A., Lacasta, D., Voigt, K., & Chemineau, P. (2021). Review: Managing sheep and goats for sustainable high yield production. *Animal: An*

<https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100293>

- Thorne, J. W., Murdoch, B. M., Freking, B. A., Redden, R. R., Murphy, T. W., Taylor, J. B., & Blackburn, H. D. (2021). Evolution of the sheep industry and genetic research in the United States: Opportunities for convergence in the twenty-first century. *Animal Genetics*, 52(4), 395-408. <https://doi.org/10.1111/age.13067>
- Ushida, K., Kinoshita, K., Ichihara, Y., Hirata, Y., Kurauchi, Y., Seki, T., & Katsuki, H. (2024). Menaquinone-4 Alleviates Neurological Deficits Associated with Intracerebral Hemorrhage by Preserving Corticospinal Tract in Mice. *Neurochemical Research*, 49(7), 1838-1850. <https://doi.org/10.1007/s11064-024-04150-8>
- Wysokińska, A. (2022). Animal Reproduction: Semen Quality Assessment. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 12(21), 2905. <https://doi.org/10.3390/ani12212905>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Zequeira, B., & Eugenio, D. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: Defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(2), 0-0.

Cuenca, 25 de septiembre del 2024

Asunto: Embargo Temporal del Trabajo de Titulación

Señor,
Ing. María Verónica Vivar Serrano
Decana de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias,
Cuenca.

De mi consideración:

Señora Decana, Yo María Belén Faicán Pauta como autora del Trabajo de Titulación **“Efecto de la concentración de la menaquinona-4 sobre el semen ovino en refrigeración”** 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.

Atentamente,



CI: 0107966897
María Belén Faicán Pauta
Autora.