



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**INTERACCIÓN IN VITRO DE LA MICROBIOTA
VAGINAL EN OVEJAS Y LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DEL SEMEN OVINO FRESCO**

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

AUTORAS: GENESIS ODALIS SARMIENTO LERAUX

DANIELA LIZBETH MARTINEZ TACURI

DIRECTOR: MANUEL ESTEBAN MALDONADO CORNEJO

CUENCA-ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**INTERACCIÓN IN VITRO DE LA MICROBIOTA
VAGINAL EN OVEJAS Y LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DEL SEMEN OVINO FRESCO**

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

AUTORAS: GENESIS ODALIS SARMIENTO LERAUX

DANIELA LIZBETH MARTINEZ TACURI

DIRECTOR: MANUEL ESTEBAN MALDONADO CORNEJO

CUENCA-ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

Genesis Odalis Sarmiento Leraux portadora de la cédula de ciudadanía N° **0959805094** y **Daniela Lizbeth Martinez Tacuri** portadora de la cédula de ciudadanía N° **2250050149**. Declaramos ser las autoras de la obra: **“Interacción in vitro de la microbiota vaginal en ovejas y la viabilidad espermática del semen ovino fresco”**, 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.

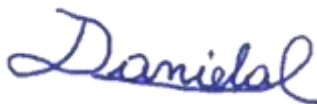
Cuenca, **12 de octubre de 2026**



F:

Genesis Odalis Sarmiento Leraux

C.I. 0959805094



F:

Daniela Lizbeth Martinez Tacuri

C.I. 2250050149

Certificación

Yo **Manuel Esteban Maldonado Cornejo** con cédula de identidad 1710012335, en calidad de director del Trabajo de Titulación con el tema: **“Interacción in vitro de la microbiota vaginal en ovejas y la viabilidad espermática del semen ovino fresco”**, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por **Genesis Odalis Sarmiento Leraux** y **Daniela Lizbeth Martinez Tacuri**, bajo mi supervisión.

Atentamente,



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**MANUEL ESTEBAN
MALDONADO CORNEJO**

ING. MANUEL ESTEBAN MALDONADO CORNEJO.
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
DOCENTE DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

AGRADECIMIENTO

Agradecemos de manera especial al laboratorio de microbiología, especialmente a la Bqf. Silvana Patricia Tamayo Avendaño, por la apertura, disposición y colaboración brindadas durante el desarrollo de esta investigación. De igual manera, extendemos nuestra gratitud al laboratorio de reproducción, especialmente al Ing. Juan Carlos Alvarado Alvarado por el respaldo brindado durante el proceso investigativo, así como por la disponibilidad de sus instalaciones y recursos, que contribuyeron de significativamente al desarrollo de los procedimientos necesarios para la realización de este proyecto.

Este trabajo es el resultado del esfuerzo conjunto con la Universidad Católica de Cuenca, de los cuales al personal docente extendemos nuestra gratitud por su apertura. Especialmente a nuestro tutor Ing. Manuel Esteban Maldonado Cornejo por su guía, dedicación y valiosas aportaciones a lo largo de este proyecto, y al Mv. Andres Leonardo Moscoso Piedra, por su colaboración y apoyo durante el desarrollo de la investigación

DEDICATORIA

“Dedico este trabajo a Dios, por ser mi guía y fortaleza durante todo este proceso, por recordarme que, aun en los días de mayor incertidumbre, la fe y la perseverancia son el impulso que me permite continuar. A mi familia y amigos, por ser un pilar fundamental en mi vida, gracias por brindarme su amor incondicional, por cada enseñanza y consejo que han marcado mi camino.

A mi mami Cristina, quien ha sido mi apoyo incondicional, mi ejemplo de perseverancia y uno de mis mayores motivos para querer seguir adelante. Gracias por estar siempre para mí, por aconsejarme, cuidarme hasta en lo más mínimo y por ser mi refugio. A Iván, por ser un apoyo constante para mí, gracias por sus consejos que han dejado huella en mi vida. A mi hermana Camila, mi motivo para ser cada día mejor, gracias por acompañarme en esta etapa y por todos los recuerdos que atesoro.

A mi hermana Damaris y a mis abuelos Eduardo y Gloria, quienes dejaron una huella imborrable en mi vida, me enseñaron que la formación no solo consiste en el área académica, sino también en cultivar empatía y humildad. Gracias por ser mi ejemplo de vida se que estarían orgullosos de verme alcanzar esta meta. Y a mis mascotas Paris y Billy, quienes fueron mi fuente de aprendizaje e inspiración durante mi formación como médica veterinaria”.

– **Con amor, Genesis Odalis Sarmiento Leraux**

“Dedico este logro, en primer lugar, a Dios, por ser mi principal soporte, mi guía y mi fortaleza durante este camino, por darme la sabiduría para afrontar las dificultades y la perseverancia para no rendirme. A mi papá, Iván, por apoyarme incondicionalmente en cada uno de mis sueños, por sus consejos y por motivarme siempre a seguir adelante; y a mi mamá, Paola, por brindarme su amor, cariño y ayuda en cada momento, siendo un apoyo fundamental en mi vida.

A mis fieles compañeros felinos, por acompañarme con su cariño y hacer más llevaderos los días difíciles; y de manera muy especial, a mi querida Minina, que, aunque ya no está físicamente conmigo, continúa ocupando un lugar importante en mi corazón. Finalmente, a Maximiliano, por ser un apoyo inmenso durante esta etapa, por su ayuda, compañía y por estar presente cuando más lo necesité. A todos ustedes, gracias por formar parte de este camino y de un logro que siempre llevaré en mi corazón”.

– **Con cariño, Daniela Lizbeth Martinez Tacuri**



Doi: <https://doi.org/10.70577/asce.v5i4.1118>

Recibido: 2026-09-11

Aceptado: 2026-09-25

Publicado: 2026-10-07

Interacción in vitro de la microbiota vaginal en ovejas y la viabilidad espermática del semen ovino fresco

In vitro interaction between ewe vaginal microbiota and sperm viability in fresh ovine semen

Autor(s)

Genesis Odalis Sarmiento Leraux¹
genesis.sarmiento@est.ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0003-1625-5948>
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Daniela Lizbeth Martínez Tacuri²
daniela.martinez.49@est.ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0008-4484-0083>
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Manuel Esteban Maldonado Cornejo³
mmaldonadoc@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-1507-2280>
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Silvana Patricia Tamayo Avendaño⁴
stamayo@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0007-6732-4498>
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Juan Carlos Alvarado Alvarado⁵
jalvaradoa@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-7240-179X>
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Andres Leonardo Moscoso Piedra⁶
amoscosop@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-4017-0165>
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca-Ecuador

Cómo citar

Sarmiento Leraux, G. O., Martínez Tacuri, D. L., Maldonado Cornejo, M. E., Tamayo Avendaño, S. P., Alvarado Alvarado, J. C., & Moscoso Piedra, A. L. (2026). Interacción in vitro de la microbiota vaginal en ovejas y la viabilidad espermática del semen ovino fresco. *ASCE MAGAZINE*, 5(4), 66–84. <https://doi.org/10.70577/asce.v5i4.1118>

Resumen

La microbiota vaginal desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del tracto reproductivo y fertilidad de los animales. En ovinos, su composición difiere de la descrita en otras especies ampliamente estudiadas donde los lactobacilos abundan, lo que se asocia con características fisiológicas particulares en el ovino, como un pH vaginal cercano a la neutralidad. A pesar de su importancia, la información disponible sobre la microbiota vaginal ovina y, especialmente, sobre su interacción in vitro con el germoplasma masculino ovino es aún limitada. Este estudio no experimental y exploratorio tuvo como objetivo determinar las condiciones técnicas necesarias para establecer in vitro la interacción entre la microbiota vaginal de ovejas y la viabilidad espermática del semen ovino fresco. A partir de ello, se desarrolló un protocolo de aislamiento anaerobio en medio MRS, orientado a la recuperación de microbiota vaginal nativa con potencial aplicación en biotecnologías reproductivas que involucren el manejo de semen. Asimismo, se demostró que el empleo de diluyentes alternativos, como agua de coco y leche UHT, junto con los extensores seminales, permite preservar simultáneamente la viabilidad bacteriana y espermática bajo las condiciones experimentales evaluadas. Finalmente, la caracterización fenotípica confirmó el aislamiento de cepas nativas de la microbiota vaginal, mientras que la evaluación mediante el sistema CASA evidenció que la interacción entre la microbiota y el semen no compromete la calidad espermática. En conjunto, estos hallazgos proporcionan una base metodológica para su uso en futuras investigaciones sobre la interacción microbiota y semen en protocolos de biotecnología reproductiva en ovinos.

Palabras claves: agua de coco, CASA, leche UHT, Microbiota Vaginal Eubiotica, MRS.

Abstract

The vaginal microbiota plays a fundamental role in maintaining the homeostasis of the reproductive tract and fertility in animals. In sheep, its composition differs from that described in other widely studied species in which lactobacilli are abundant, which is associated with particular physiological characteristics of sheep, such as a near-neutral vaginal pH. Despite its importance, available information on the ovine vaginal microbiota, particularly its in vitro interaction with male ovine germplasm, remains limited. This non-experimental and exploratory study aimed to determine the technical conditions required to establish an in vitro interaction between the vaginal microbiota of ewes and the sperm viability of fresh ram semen. Based on this approach, an anaerobic isolation protocol using MRS medium was developed to recover native vaginal microbiota with potential applications in reproductive biotechnologies involving semen handling. Furthermore, the use of alternative extenders, such as coconut water and UHT milk, together with seminal extenders, was shown to simultaneously preserve bacterial and sperm viability under the experimental conditions evaluated. Finally, phenotypic characterization confirmed the isolation of native strains from the vaginal microbiota, while evaluation using the CASA system showed that the interaction between the microbiota and semen did not compromise sperm quality. Overall, these findings provide a methodological basis for future research on microbiota–semen interactions in reproductive biotechnology protocols in sheep.

Keywords: Coconut water; CASA; UHT milk; eubiotic vaginal microbiota; MRS

Introducción

La microbiota vaginal está conformada por bacterias comensales que ayudan al equilibrio fisiológico del tracto reproductivo. Esta desempeña un papel determinante en el éxito reproductivo ovino, ya que las alteraciones en su equilibrio se asocian con fallos en la fertilidad, por lo que se ha identificado que la presencia de bacterias proinflamatorias en el tracto genital puede comprometer la capacidad reproductiva del animal. (Serrano, 2020) describen que el microbioma de la vagina de ovejas en el resultado de la inseminación artificial en ovinos, donde encontraron que la composición bacteriana del tracto genital de las ovejas está claramente asociada con el éxito o fracaso de la IA (Inseminación artificial). Así mismo, los autores identificaron que la presencia de géneros bacterianos como *Mageebacillus*, *Histophilus*, *Actinobacillus* y *Sneathia* se asocia con menores tasas de preñez y con rebaños que presentan elevados índices de fracaso en la IA. Así mismo (Reinoso-Pelaez, 2025) observaron que la microbiota vaginal puede diferir su composición entre ovejas gestantes y no gestantes, sugiriendo que su equilibrio favorece la eficiencia reproductiva.

A pesar de que diferentes investigaciones han evaluado la microbiota vaginal y su asociación con resultados reproductivos a través de estudios observacionales, los estudios experimentales que evalúen bajo condiciones in vitro en cómo son compatibles tanto las bacterias aisladas de la microbiota y los efectos sobre calidad espermática y parámetros del semen, son escasos.

Es esencial poder comprender cómo interactúan entre el semen y la microbiota vaginal para generar un desarrollo de estrategias que ayuden a mejorar las biotecnologías reproductivas en ovinos. Al mejorar esta área, generando evidencia experimental mejora el desarrollo de estrategias teniendo acceso a nuevas alternativas reproductivas ya que la aplicación de determinadas técnicas de IA, como la inseminación laparoscópica, puede generar una respuesta fisiológica de estrés en las hembras, reflejada por el incremento de los niveles de cortisol durante y después del procedimiento, lo que plantea consideraciones relevantes en términos de bienestar animal y por ende su capacidad productiva (Costa, 2026), sumado a los mayores costos dando limitaciones por parte de pequeños y medianos productores al acceso a los beneficios de esta tecnología reproductiva (Asaduzzaman M, 2021), lo que demanda un mayor estudio de las

biotecnologías reproductivas asociadas a la participación de la microbiota en la reproducción.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar in vitro el efecto de la microbiota vaginal de cepas aisladas del tracto reproductivo de una hembra ovina adulta sobre la viabilidad del semen ovino diluido en un crioprotector. Por ende, se tomó en consideración establecer condiciones asépticas de una oveja adulta obteniendo cepas microbianas del tracto vaginal de un animal clínicamente sano, identificar el agente patógeno más común en una hembra adulta aparentemente sana y aplicar un protocolo de toma de muestras y aislamiento de bacterias anaerobias del tracto reproductivo de hembras adultas con una microbiota eubiótica. Los resultados que se obtuvieron pueden contribuir a conocimientos asociados a la interacción que hay entre el espermatozoide y la microbiota proporcionando información útil para la mejora de biotecnologías reproductivas.

Material y métodos

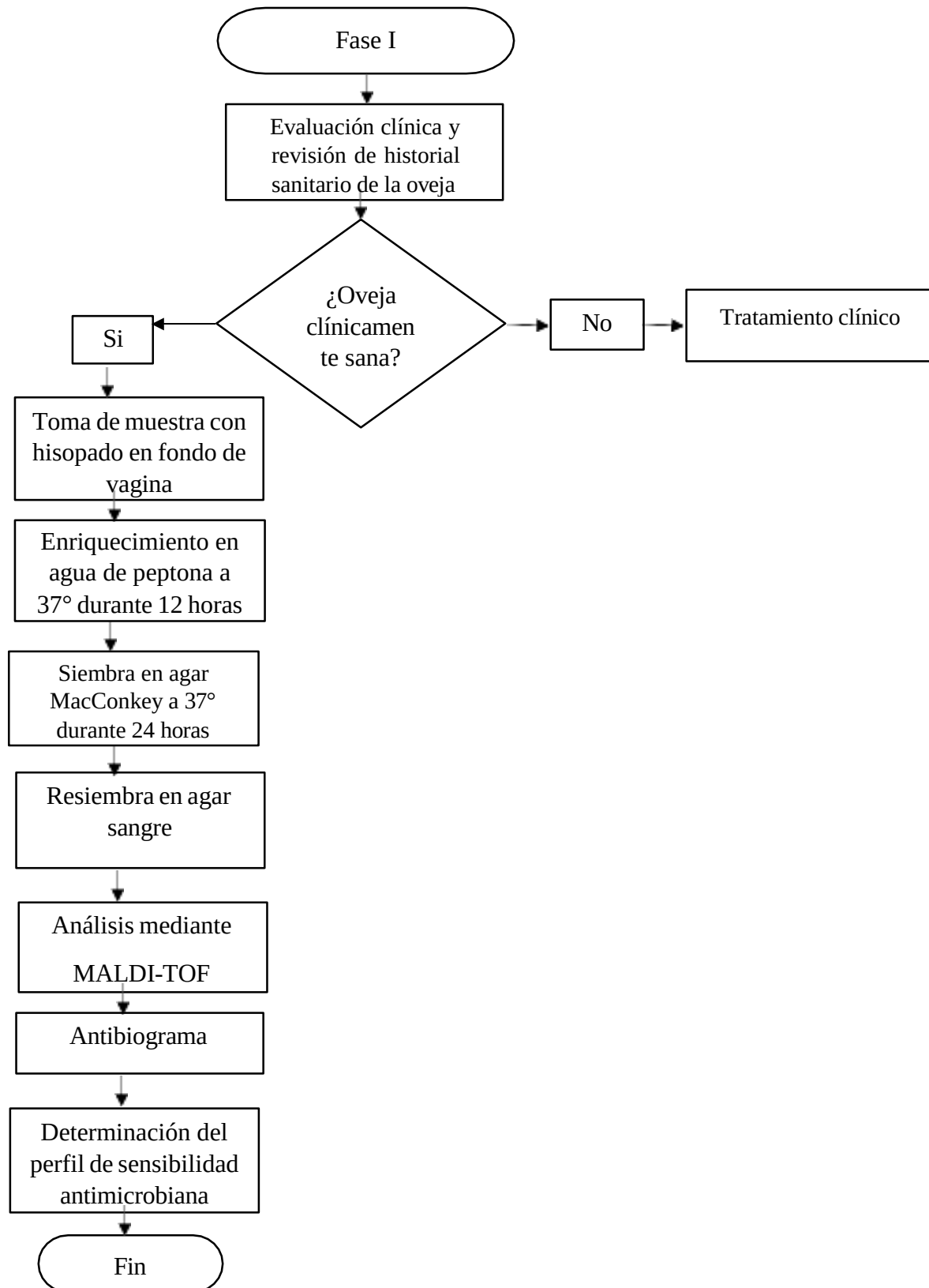
La investigación se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo y de tipo exploratorio con diseño no experimental. Se estructuró en una fase de campo para la selección animal y obtención de muestras, y una fase de laboratorio para el aislamiento, caracterización microbiológica y la evaluación de la interacción in vitro entre microorganismos de la microbiota vaginal eubiótica y semen ovino fresco.

La población estuvo constituida por ovinos adultos bajo un muestreo intencional, seleccionando una oveja clínicamente sana y un carnero con parámetros reproductivos óptimos. Como criterios de inclusión para la hembra se consideró la edad adulta, ausencia de patologías reproductivas, condición corporal adecuada y ningún tratamiento antibiótico previo de 30 días, excluyendo animales con alteraciones clínicas; del mismo modo, se evaluó la idoneidad clínica y seminal del carnero.

La recolección de datos combinó la observación clínica directa, fichas de registro y una bitácora de laboratorio para el control de procedimientos, temperaturas y tiempos. Las muestras biológicas se procesaron mediante técnicas microbiológicas convencionales (cultivos, tinción de Gram, MALDI-TOF y antibiograma) y análisis cinemático del semen, cumpliendo rigurosamente con las consideraciones éticas de bienestar animal.

Figura 1.

Flujograma de evaluación clínica de la oveja seleccionada para el estudio

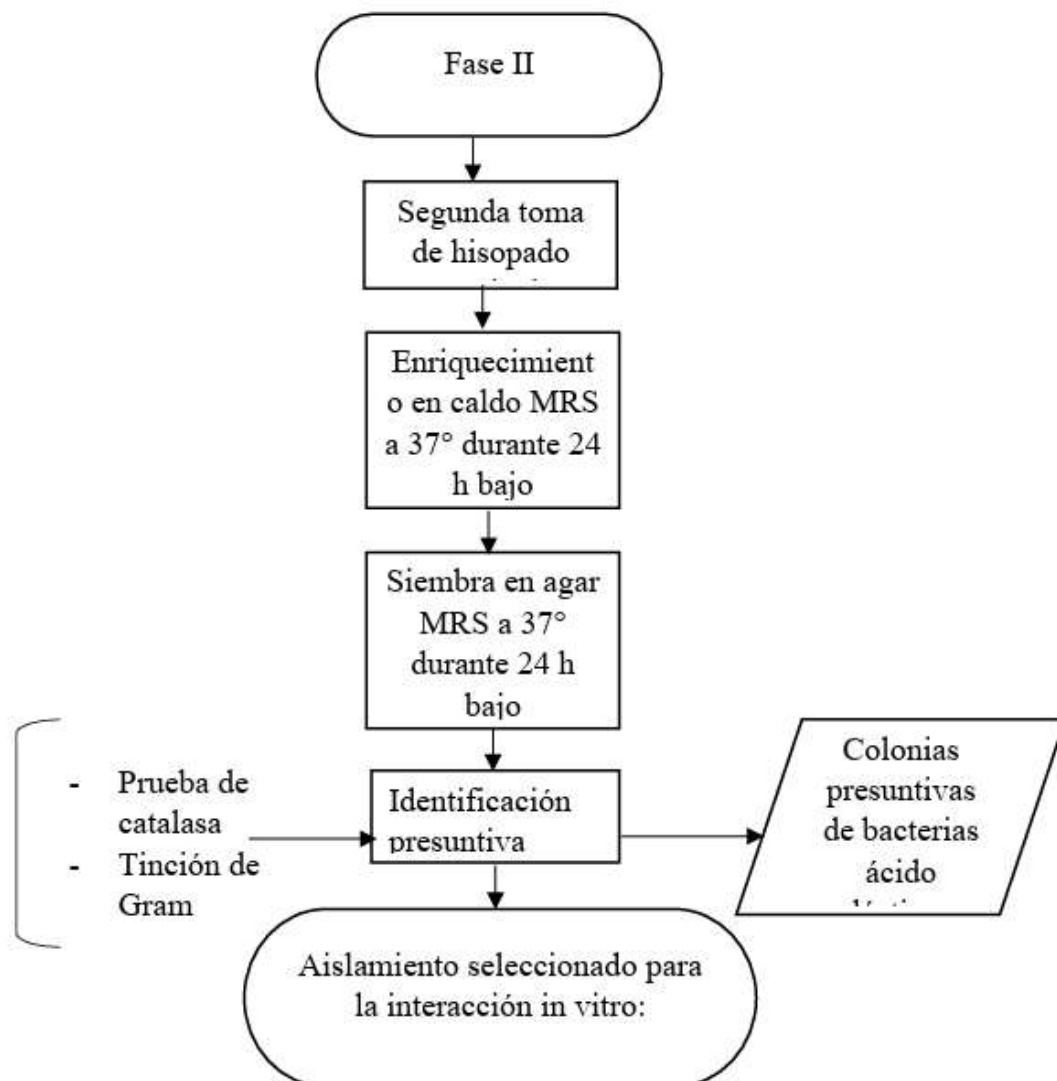




En la primera fase se evaluó a la oveja con examen clínico completo y revisión de historial sanitario confirmando el estado de salud y descartando presencia de enfermedades en una oveja adulta seleccionada para el estudio. Después de una valoración física se tomó una muestra con hisopo en fondo de vagina bajo condiciones asépticas.

Posteriormente se llevó la muestra al laboratorio de microbiología, siguiendo un protocolo de bioseguridad, se enriqueció con agua de peptona por 12 horas en incubación aerobia a 37° para posterior siembra en agar MacConkey incubando durante 24 horas de forma aerobia a 37°. Al obtener las colonias se sembró en agar sangre para enviarlas a MALDI-TOF.

Luego de obtener los resultados del laboratorio, la cepa conservada se sembró en Agar Mueller Hinton y se colocaron cinco discos de antibióticos de uso frecuente en producción ovina: tetraciclina, amoxicilina, enrofloxacin, ceftiofur y trimetoprim/sulfametoxazol, para poder determinar la susceptibilidad antimicrobiana.

Figura 2.*Aislamiento de cepa bacteriana obtenida de muestra vaginal*

En la segunda fase, una vez confirmado el estado clínico saludable de la oveja mediante la revisión de la ficha clínica y la evaluación clínica, se realizó una nueva toma de muestra mediante hisopado vaginal bajo condiciones asépticas. La muestra se inoculó en caldo MRS y se incubó a 37° durante 24 horas bajo condiciones de anaerobiosis, con el propósito de favorecer el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL).

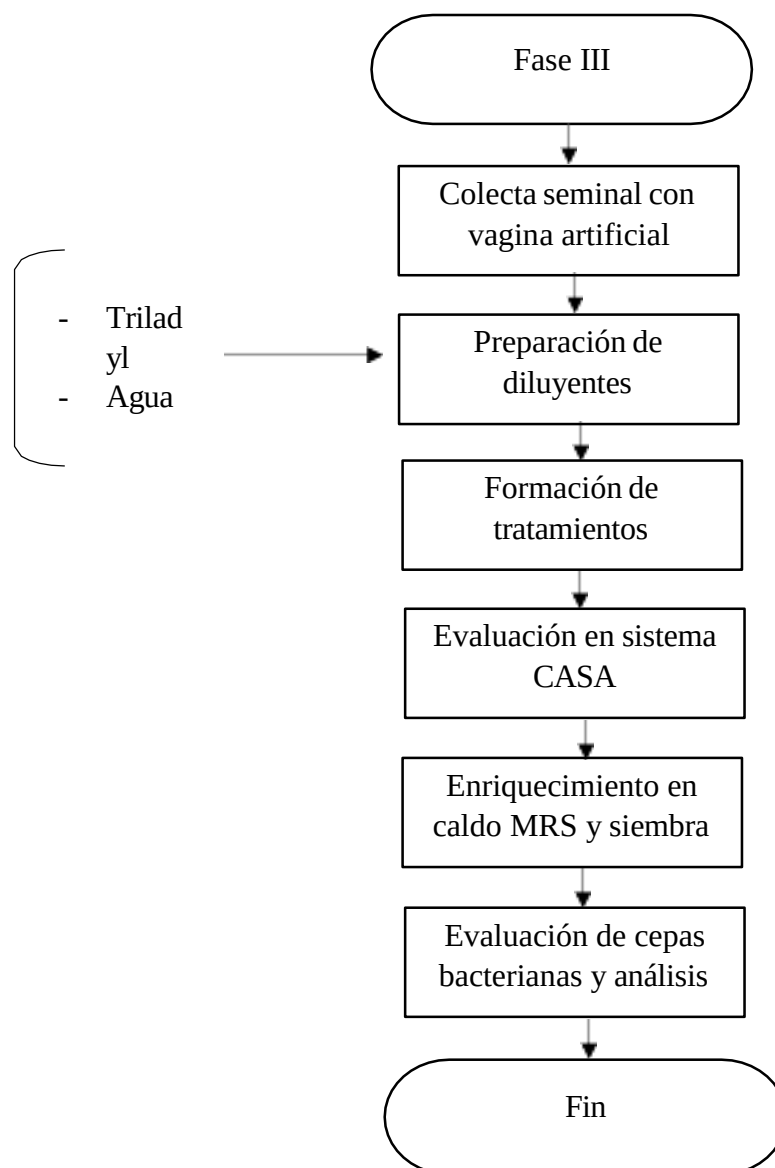
Posteriormente, se realizó la siembra en agar MRS de la muestra obtenida tras el enriquecimiento previo en caldo MRS. Las placas se incubaron a 37° durante 24 horas bajo condiciones anaeróbicas. El tiempo total correspondiente para obtener bacterias aisladas ante el enriquecimiento en caldo MRS (24 horas) y la posterior incubación en agar MRS (24 horas) fue de 48 horas.

Para la identificación presuntiva de las bacterias aisladas, se realizaron tinciones de Gram para observar sus características morfológicas y reacción tintorial mediante microscopía, además de la prueba de catalasa. La obtención de cepas presuntivamente compatibles con bacterias ácido-lácticas (BAL) se determinó considerando las características observadas en la tinción de Gram y el resultado de la prueba de catalasa.

Las cepas obtenidas fueron denominadas “Tratamiento 1” debido a que corresponden al primer grupo de microorganismos aislados y seleccionados de la microbiota vaginal de la oveja para evaluar posteriormente su interacción in vitro con el semen ovino.

Figura 3.

Fase experimental de testeo microbiológico + semen de carnero



Como tercera fase tenemos la colecta de semen con vagina artificial y generación de tratamientos. Se colectó el semen y se llevó al laboratorio de reproducción para evaluar bajo el microscopio y verificar que tuviera >80% de motilidad masal y concentración espermática $\geq 4.5 \times 10^6$ espermatozoides/ml en el fotómetro.

Se preparó una solución madre de 1,8 ml de agua ultrapura, 0,6 ml de yema de huevo y 0,6 ml de Triladyl obteniendo 3 ml de diluyente en un tubo falcon. Además, se usaron otros diluyentes en soluciones de dos tipos. La primera: 0,5 ml de yema de huevo, 3 ml de agua de coco y la segunda: 0,5 ml yema de huevo, 3 ml de leche UHT (ultra-high temperatura). Se realizó el mismo procedimiento de colocar a baño maría a una temperatura de 37° en los tres diluyentes hasta la colecta de la muestra seminal, en estos dos diluyentes no se usaron antibióticos. Al ser tres diferentes diluyentes subdivididos en cuatro tratamientos cada uno, se trabajó con un diluyente por semana para su correspondiente evaluación.

Se obtuvieron tres colectas de semen ovino (una por semana) a una concentración $\approx 4800 \times 10^6$ espermatozoides/ml, que fue mezclada en cada diluyente.

Para la generación de los tratamientos se colocó 1000 microlitros en cada uno de los tubos eppendorf obteniendo los siguientes tratamientos:

- T1.- Solo Colonias bacterianas (obtenidas de la siembra en agar MRS)
(El tratamiento 1 tuvo un rol analítico que permitió verificar que las cepas seguían vivas sin necesidad de la existencia de otro elemento).
- T2.- Semen + diluyente + 10 μ L de solución bacteriana (T2.1.-Triladyl, T2.2.-Coco y T2.3.-Leche), en 1000 microlitros.
- T3 Semen + diluyente + solo caldo MRS (T3.1.-Triladyl, T3.2.-Coco y T3.3.-Leche) en 1000 microlitros.
- T4.- Semen +Diluyente (T4.1.-Triladyl, T4.2.-Coco y T4.3.-Leche) en 1000 microlitros.

Se diluyó 138 colonias bacterianas obtenidas del tratamiento 1 en 1ml de agua ultrapura ajustando visualmente a 0,5 McFarland, de esa dilución se colocó 10 microlitros en el tratamiento 2.

El grupo de tratamientos que se hizo con Triladyl se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología durante 24h a 37° y fueron evaluadas a las 24 horas para posterior

observación de espermatozoides en el sistema CASA y de las bacterias, después de la siembra en agares.

Los otros tratamientos de las soluciones con leche y agua de coco, se dejó en refrigeración a una temperatura de 5° durante 24 horas para después evaluar en el sistema CASA (T2, T3, T4) y en la siembra en agares (T2) para la recuperación bacteriana en agar MRS.

Finalmente, para identificar el tipo de bacteria de la microbiota se analizó las bacterias aisladas de la mezcla con cada uno de los diluyentes; contrastando los resultados con las coincidencias del proceso anterior.

Resultados

Tabla 1.

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos

Especie Bacteriana	Antibióticos				
	TE	AMX	ENR	EFT	SXT
<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S

Método usado para la susceptibilidad antimicrobiana fue de difusión en disco (Kirby-Bauer) de acuerdo al criterio de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

El resultado obtenido en MALDI-TOF confirmó *Escherichia Coli* obtenidas del enriquecimiento en agua de peptonas y sembradas en agar MacConkey de muestra vaginal ovina, por lo tanto, los resultados interpretados bajo la guía de CLSI la cepa *Escherichia Coli* no presentó resistencia o susceptibilidad intermedia a ninguno de los cinco antibióticos evaluados, determinando como susceptible a todos ellos.

Al poder determinar la susceptibilidad de los antimicrobianos evaluados permite complementar la caracterización microbiológica de la muestra vaginal obtenida de una oveja clínicamente sana, a su vez toma relevancia ya que la *E. Coli* constituye a un organismo de importancia por su resistencia antimicrobiana, un estudio realizado consistió en 500 aislamientos e identificó resistencia del 21% a ceftiofur, 53,2% a tetraciclina, 34,2% a enrofloxacin, 43,6% a la ampicilina, sulfisoxazol un 82,4%, además que del 75,4% presentó resistencia a más de tres antimicrobianos que fueron resaltados como multirresistentes (Zhao, 2021). Por lo tanto, el resultado obtenido no presentaba un fenotipo resistente, sin embargo, hay que tomar en cuenta que en el estudio se identificó

de una sola hembra ovina y no puede presentarse de que la *E. Coli* de origen vaginal presenta sensibilidad generalmente ante estos antimicrobianos presentados.

Comportamiento de los tratamientos formulados con Triladyl como diluyente

En los tratamientos realizados con el diluyente a base de Triladyl se mantuvo el mismo diseño experimental con la diferencia que se incubó a 37°, finalizando el periodo de incubación por 24 horas no se observó vitalidad espermática y no se obtuvo la recuperación bacteriana. Debido a la muerte de los espermatozoides en los tratamientos formulados con este tipo de solución madre, no fueron incluidos para el análisis de los parámetros de movilidad espermática en el sistema CASA. La ausencia de bacterias post-incubación podría estar relacionado con la composición antimicrobiana que contiene el Triladyl como la tilosina, espectinomycin, gentamicin y lincomicina (Abdel-Aziz Swelum, 2019). Las condiciones de conservación de semen son determinantes, una revisión señala que durante el almacenamiento el espermatozoide puede sufrir estrés osmótico, térmico y bioquímico asociándolos con alteraciones de membrana, disminución en la producción de ATP, entre otros, a su vez indica que en protocolos de conservación líquida el semen después de la eyaculación se mantiene a 37° para conservar a 5° – 15° (Rizkallah, 2022).

Tabla 2. Análisis de efecto de Bacterias y Diluyentes sobre la Calidad Espermática.

Tratamiento	Progresivos	No Progresivos	Inmoviles	STR%	LIN%
T2(semen+ diluyente + bacterias) (n=6)	14,56 ± 2,75	48,64 ± 37,54	36,50 ± 40,72	54,91 ± 3,45	37,69 ± 3,87
T3 (semen+diluyente+caldo) (n=6)	12,61 ± 3,55	60,55 ± 40,78	27,85 ± 38,64	49,96 ± 7,54	31,17 ± 9,68
T4 (semen+diluyente) (n=6)	19,69 ± 3,18	62,77 ± 19,26	17,52 ± 16,04	55,18 ± 1,61	38,60 ± 2,18
Valor p	0,217	0,907	0,859	0,553	0,503
Coco (n=9)	16,56 ± 4,83	34,32 ± 13,72	49,77 ± 18,81	56,32 ± 1,03	39,52 ± 1,32

Leche UTH (n=9)	14,68 ± 3,99	80,32 ± 7,87	4,80 ± 3,78	50,38 ± 5,04	32,11 ± 6,83
Valor p	0,631	0,007	0,015	0,116	0,138

Datos obtenidos de la evaluación en el sistema CASA.

El análisis en el efecto de los tratamientos sobre la calidad espermática, no hubo diferencias estadísticas entre el T2 (semen+diluyente+bacterias) frente a T3 (semen+diluyente+caldo MRS) y T4 (semen+diluyente), lo que indica que el caldo MRS o bacterias no afectan la progresividad ni cinemática del semen. En cuanto a los diluyentes si se encontró diferencias estadísticas en los porcentajes de espermatozoides no progresivos ($p=0,007$) e inmóviles ($p=0,015$). En el caso de la leche presentó un porcentaje mayor de espermatozoides no progresivos en comparación del diluyente con coco, sin embargo, el porcentaje de espermatozoides inmóviles fue mayor en el diluyente con coco a comparación del de leche. No se observó diferencias significativas en los dos diluyentes para el porcentaje de espermatozoides progresivos ($p = 0,631$), STR ($p = 0,116$) y LIN ($p = 0,138$).

El resultado obtenido de este estudio difiere parcialmente de lo que fue reportado por (Yániz, 2010), indicando que la contaminación bacteriana del semen disminuía su calidad en viabilidad, velocidad y motilidad durante su almacenamiento a 15°, usando cultivos puros de bacterias de forma individual como la *E. cloacae*, *P. mirabillis*, *E. coli*, entre otros, la *E. coli* dio un marcado deterioro de estos parámetros, mientras que en nuestro estudio mezcló a bacterias recuperadas de la cavidad vaginal mediante el cultivo en agar MRS y fueron diluidas en agua ultrapura. Sin embargo, el estudio también observó que la movilidad y progresividad no se vieron afectadas si las enterobacterias no eran mayores a 100 UFC/mL. Por lo tanto, al poder ver que no hay diferencias significativas bajo condiciones experimentales usadas como el tipo y concentración de bacterias, la comunidad de bacterias que se cultivó no produjo alteración detectable en los parámetros establecidos por el CASA.

Por otro lado, se pudo observar que el tipo de diluyente produjo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides no progresivos e inmóviles. El uso de la yema de huevo y leche como diluyentes para el semen ha sido estudiado por su capacidad en proporcionar componentes protectores manteniendo la funcionalidad espermática en su conservación. (Galarza, 2020), evaluó el semen de carnero refrigerándolo con un diluyente a base de yema de huevo y leche descremada y observaron modificaciones

favorables en los parámetros cinemáticos e integridad de la membrana. En cuanto con el agua de coco y yema de huevo mostró mayoría en espermatozoides inmóviles, esto se podría ver relacionado a su composición, ya que, se ha demostrado ciertos resultados variables dependiente de su formulación y conservación según estudios realizados demuestran que los diluyentes basados en coco es una alternativa como conservación, aunque su desempeño dependa de su composición, especie, tiempo, tipo de coco y método de conservación (Cavalcante, 2014); (Reis, 2023).

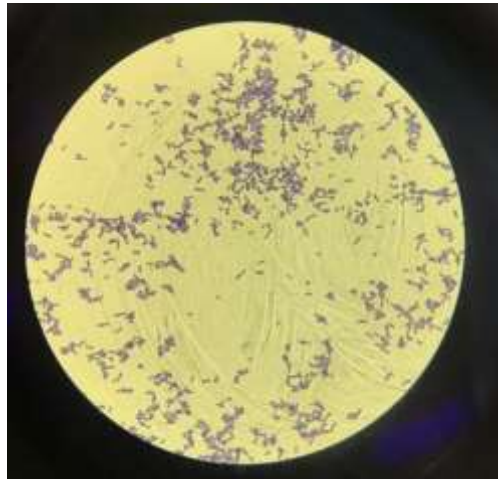
En los parámetros de trayectoria espermática (STR) y linealidad (LIIN) no hubo una diferencia significativa entre los dos diluyentes indicando que a pesar de que los diluyentes modificaran la proporción de los espermatozoides (espermatozoides no progresivos e inmóviles), no se evidenció alguna modificación significativa de forma estadística en patrones de trayectoria de espermatozoides que estuvieron móviles.

Identificación presuntiva de las bacterias aisladas en agar MRS

A partir de las muestras obtenidas de un hisopado vaginal se obtuvo colonias bacterianas en agar MRS, se seleccionó aislados para identificar mediante prueba de catalasa y tinción de Gram. Post-tratamientos se hizo el mismo procedimiento mencionado en la metodología dándonos los siguientes resultados del cuadro 3.

Tabla 3. Identificación presuntiva

Aislado	Tinción de Gram	Morfología	Catalasa	Identificación presuntiva
T1	Gram positiva	Bacilos cortos	Negativa	Compatible con BAL
T2 – Diluyente 1	Gram positiva	Bacilos cortos	Negativa	Compatible con BAL
T2 – Diluyente 2	Gram positiva	Bacilos cortos	Negativa	Compatible con BAL

Imagen 1.Identificación microscópica de aislados **Imagen 1.**

bacterianos mediante el método tinción de Gram. Se pudo observar bacterias Gram positivas, siendo de predominancia la morfología bacilar corta. Las mismas características fueron observadas en el tratamiento 1 y tratamiento 2 de los dos diluyentes.

Las bacterias ácido lácticas en el tracto reproductivo se relaciona con el equilibrio y efecto protector ante agentes perjudiciales en el tracto reproductivo estudios han identificado que la composición microbiana se relaciona con resultados en el área de reproducción ya que destaca su salud reproductiva en la hembra ovina (Reinoso-Pelaez, 2025). Un trabajo reciente hizo una evaluación en la incorporación de bacterias ácido lácticas en el semen de carnero diluido y estudió como era su interacción dando como resultado un >75% en condiciones de la motilidad espermáticas sin observar efectos adversos sobre la fragmentación de ADN (Toledo-Perona, 2026). En concordancia con los antecedentes presentados en nuestro estudio no se encontró diferencias significativas entre las bacterias y los parámetros del sistema CASA dando como resultado que bajo condiciones controladas no produjo alteración detectable, sin embargo, no se puede atribuir a las bacterias ácido lácticas tiene efecto protector o antibacteriano sobre el semen ya que nuestro objetivo no incluyo inocular una bacteria específica para la cuantificación de su inhibición como lo hizo el estudio de (Toledo-Perona, 2026).

Discusión

A diferencia del modelo humano, caracterizado por la dominancia de *Lactobacillus* y un entorno ácido, la vagina ovina presenta un pH neutro y una comunidad intrínsecamente polimicrobiana y diversa. En este ecosistema, la caracterización microbiológica confirmó la presencia y adaptabilidad de bacterias ácido-lácticas, las cuales, a pesar de su baja abundancia relativa en rumiantes, cumplen un rol fundamental en la modulación del microambiente vaginal (Reinoso-Pelaez, 2025). Aislar estas poblaciones benéficas representa un reto metodológico que requiere medios enriquecidos selectivos para su correcta captura frente a la alta diversidad nativa (Swartz, 2014).

En cuanto a la conservación seminal, el uso del extensor comercial Triladyl e incubado a 37 °C durante 24 horas provocó la pérdida total de la viabilidad espermática y la ausencia de desarrollo microbiano. Esto demuestra que los diluyentes comerciales diseñados para criopreservación no son aptos para la conservación líquida prolongada a temperatura corporal, debido al estrés térmico, osmótico y metabólico, sumado a la acción sinérgica de sus agentes antimicrobianos específicos (Rizkallah, 2022).

Por el contrario, los diluyentes alternativos evaluados en refrigeración 5 °C permitieron analizar la interacción con las bacterias sin que su adición afectará negativamente la cinemática espermática evaluada mediante el sistema CASA ($p > 0.05$), un hallazgo consistente con otros estudios sobre compatibilidad microbiana en semen ovino diluido (Toledo-Perona, 2026). No obstante, se identificaron diferencias significativas atribuibles a la naturaleza de los diluyentes: la leche UHT incrementó los espermatozoides no progresivos ($p = 0.007$) gracias al efecto protector de sus caseínas sobre la membrana plasmática, mientras que el agua de coco elevó los porcentajes de inmovilidad ($p = 0.015$), lo cual podría relacionarse con variaciones osmóticas o composicionales del sustrato vegetal (Reis, 2023). A pesar de estas variaciones, los parámetros de velocidad y linealidad se mantuvieron estables ($p > 0.05$), lo que respalda el potencial de estos diluyentes alternativos para futuras investigaciones en biotecnologías reproductivas ovinas.

Conclusiones

Mediante condiciones asépticas en la toma de muestra, en el cultivo en caldo y agar MRS se logró recuperar y obtener bacterias que son cultivables a partir del tracto reproductivo de una hembra ovina adulta clínicamente sana. Tras descartar indicios de infección mediante evaluación clínica, ficha y susceptibilidad ante los cinco antibióticos evaluados, se identificó la coexistencia de bacilos cortos Gram positivos en el tracto vaginal, confirmando la diversidad fenotípica de la microbiota vaginal ovina saludable. Como punto importante bajo las condiciones evaluadas entre el semen y las bacterias fueron capaces de su recuperación en condiciones experimentales, de la misma manera el semen no mostró resultados significantes en su cinemática ante esta interacción. No obstante, estas cepas requieren ser purificadas para facilitar su caracterización y potencial aprovechamiento en futuras investigaciones.

La presencia de bacterias cultivables no produjo alguna diferencia significativa en parámetros evaluados por el sistema CASA por lo tanto el método diseñado para la toma de muestras y cultivo anaeróbico en medio MRS, permite el aislamiento de cepas nativas de forma eficiente, permitiendo su viabilidad posterior a las pruebas de interacción con muestras espermáticas. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales utilizadas, la adición de estas bacterias al semen ovino no evidenció un efecto beneficioso ni perjudicial detectable sobre la cinética espermática.

Es así que la implementación de este protocolo genera una base técnica para la obtención de muestras de microbiota vaginal ovina y su posterior aplicación en biotecnologías reproductivas puede ayudar a futuras investigaciones para evaluar aislados bacterianos de forma individual con identificación molecular para estudiar su viabilidad espermática. De la misma manera es esencial controlar el tipo de diluyente, presencia de antibióticos el tiempo de la evaluación o incubación, temperatura a conservación y el uso recomendable de bacterias ácido lácticas.

Referencias bibliográficas

- Abdel-Aziz Swelum, A., M Saadeldin, I., Ba-Awadh, H., G Al-Mutary, M., F Moumen, A., N Alowaimier, 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>
- Asaduzzaman, M., Saha, A., Alam, M. G. S., & Bari, F. Y. (2021). Cost comparison of artificial insemination and natural service in sheep breeding system. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 11(4), 126–130. <https://doi.org/10.51227/ojafr.2021.19>
- Cavalcante, J. M. M., Brasil, O. O., Salgueiro, C. C. M., Salmito-Vanderley, C. S. B., & Nunes, J. F. (2014). Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Ciência Animal Brasileira*, 15(3), 344–353. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v15i327834>
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2020). Supplementing a skimmed milk–egg yolk-based extender with L-carnitine helps maintain the motility, membrane integrity and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(7), 805–813. <https://doi.org/10.1111/rda.13687>
- Gasperin Guazzelli Costa, V., Pereira de Moraes, F., Tomazele Rovani, M., Ferreira, R., Farias Vargas, J. S., Caetano de Oliveira, F., Garziera Gasperin, B., Ivan Gehrcke, M., Diniz Vieira, A., & Mondadori, R. G. (2026). Laparoscopic Artificial Insemination Affects Stress and Inflammatory Markers in Ewes. *Journal of applied animal welfare science : JAAWS*, 29(3), 491–500. <https://doi.org/10.1080/10888705.2025.2564991>
- Reinoso-Peláez, E. L., Puente-Sánchez, F., Serrano, M., Calvo, J. H., Ramón, M., & Saura, M. (2026). Characterization of bacterial communities of ewe's vaginal tract and its potential impact on reproductive efficiency. *Animal Microbiome*, 7, 48. <https://doi.org/10.1186/s42523-025-00383-2>
- Reis, R., R. A., Torres, R. N. S., Ribeiro, I. M., Torres, C. A. A., & de Freitas, B. W. (2023). Coconut water-based extender for seminal preservation in small ruminants: A meta-analysis study. *Small Ruminant Research*, 220, Article 106915. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.106915>
- Rizkallah, N., Chambers, C. G., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2022). Factors affecting the survival of ram spermatozoa during liquid storage and options for improvement. *Animals*, 12(3), Article 244. <https://doi.org/10.3390/ani12030244>
- Serrano, M., Climent, E., Freire, F., Martínez-Blanch, J. F., González, C., Reyes, L., Solaz-Fuster, M. C., Calvo, J. H., Jiménez, M. Á., & Codoñer, F. M. (2020). Influence of the Ovine Genital Tract Microbiota on the Species Artificial Insemination Outcome. A Pilot Study

in Commercial Sheep Farms. *High-throughput*, 9(3), 16.
<https://doi.org/10.3390/ht9030016>

- Swartz, J. D., Held, J., Epperson, W., Daniel, J., & Perry, G. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of Lactobacilli and near-neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science*, 1, 19. DOI: 10.3389/fvets.2014.00019
- Toledo-Perona, R., Gomis, J., Sánchez, A., Toquet, M., Bailon-Larrañaga, N., Bataller, E., De la Fe, C., & Gómez-Martín, Á. (2026). Addition of lactic acid bacteria to diluted ram semen as vehicle for vaginal inoculation: interaction with seminal microbiota, sperm quality and antibacterial in vitro effect against *Mycoplasma agalactiae*. *BMC Veterinary Research*, 22(1), Artículo 236. <https://doi.org/10.1186/s12917-026-05536-2>
- Yániz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J. A., & Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal reproduction science*, 122(1-2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>
- Zhao, X., Lv, Y., Adam, F. E. A., Xie, Q., Wang, B., Bai, X., Wang, X., Shan, H., Wang, X., Liu, H., Dang, R., Wang, J., & Yang, Z. (2021). Comparison of antimicrobial resistance, virulence genes, phylogroups, and biofilm formation of *Escherichia coli* isolated from intensive farming and free-range sheep. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 699927. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.699927>

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe conflicto de interés posible.

Financiamiento:

No existió asistencia financiera de partes externas al presente artículo.

Agradecimiento:

N/A

Nota:

El artículo no es producto de una publicación anterior.

Genesis Odalis Sarmiento Leraux portadora de la cédula de ciudadanía N° **0959805094** y **Daniela Lizbeth Martinez Tacuri** portadora de la cédula de ciudadanía N° **2250050149**. En calidad de autoras y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Interacción in vitro de la microbiota vaginal en ovejas y la viabilidad espermática del semen ovino fresco”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

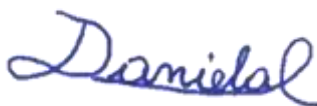
Cuenca, **12 de octubre de 2026**



F:

Genesis Odalis Sarmiento Leraux

C.I. 0959805094



F:

Daniela Lizbeth Martinez Tacuri

C.I. 2250050149