

EFFECTO DEL COMPLEJO CICLODEXTRINA - COLESTEROL SOBRE LA CALIDAD SEMINAL PRE Y POST CRIOPRESERVACIÓN EN OVINO PELIBUEY Y BLACKBELLY

EFFECT OF THE CYCLODEXTRIN-CHOLESTEROL COMPLEX ON SEMEN QUALITY PRE AND POST CRYOPRESERVATION IN PELIBUEY AND BLACKBELLY SHEEP

Carlos Andrés Mancheno Herrera¹, Julio César Llerena Zambrano², Héctor Ramiro Herrera Ocaña³, Luis Agustin Condolo Ortiz⁴, Sandra Paulina Mullo Paucar⁵

{andres.mancheno@esPOCH.edu.ec¹, julio.llerena@esPOCH.edu.ec², hector.herrerao@esPOCH.edu.ec³, luis.condolo@esPOCH.edu.ec⁴, sandry.pau09@gmail.com⁵}

Fecha de recepción: 1/12/2025 / Fecha de aceptación: 23/12/2025 / Fecha de publicación: 06/01/2026

RESUMEN: La criopreservación de semen ovino es una herramienta importante para mejorar la reproducción, pero en razas como Pelibuey y Blackbelly sigue siendo un reto porque el semen pierde calidad al congelarse y descongelarse. Esta situación limita el uso de material genético en la Provincia de Pastaza, donde estas razas son comunes y se necesitan métodos más eficientes. Por eso, este estudio buscó evaluar si el complejo colesterol-ciclodextrina (CLC) podía ayudar a proteger los espermatozoides y mejorar su calidad después de la congelación. El objetivo principal fue comprobar si diferentes dosis de CLC ofrecían un mejor cuidado de la membrana espermática. Para esto, se trabajó con un total de 24 pajuelas, que fueron las unidades experimentales, obtenidas de cuatro tratamientos: uno sin CLC y tres con 0,5; 1,0 y 1,5 mg. y tres repeticiones. Las pajuelas fueron enfriadas y luego congeladas y se evaluaron características macroscópicas y microscópicas. Los resultados mostraron que las dosis de CLC (0,5 y 1,0 mg) ayudaron a mantener mejor la estructura de los espermatozoides después de la descongelación. En conclusión, el uso del complejo CLC puede ser una opción útil para mejorar la calidad del semen ovino congelado en Pastaza, y se recomienda seguir investigando otras concentraciones y trabajar con más animales para confirmar estos resultados.

Palabras clave: *criopreservación, colesterol, ciclodextrina, Pelibuey, Blackbelly, semen ovino*

¹Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias Pecuarias, <https://orcid.org/0000-0002-2682-0336>.

²Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias Pecuarias, <https://orcid.org/0000-0001-9434-184X>.

³Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias Pecuarias, Unidad Académica y de Investigación en especies menores, <https://orcid.org/0000-0001-8145-1572>.

⁴Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias Pecuarias, <https://orcid.org/0000-0002-4811-116X>.

⁵Investigadora independiente – Riobamba – Ecuador, <https://orcid.org/0009-0007-5626-5373>.

ABSTRACT: Cryopreservation of sheep semen is an important tool for improving reproduction, but in breeds like Pelibuey and Blackbelly, it remains a challenge because semen loses quality when frozen and thawed. This situation limits the use of genetic material in the Pastaza Province, where these breeds are common and more efficient methods are needed. Therefore, this study sought to evaluate whether the cholesterol-cyclodextrin complex (CLC) could help protect spermatozoa and improve their quality after freezing. The main objective was to determine if different doses of CLC offered better protection of the sperm membrane. A total of 24 straws, which served as the experimental units, were obtained from four treatments: one without CLC and three with 0.5, 1.0, and 1.5 mg, with three replicates. The straws were chilled and then frozen, and macroscopic and microscopic characteristics were evaluated. The results showed that the CLC doses (0.5 and 1.0 mg) helped to better maintain sperm structure after thawing. In conclusion, the use of the CLC complex may be a useful option for improving the quality of frozen sheep semen in Pastaza, and further investigation of other concentrations and with more animals is recommended to confirm these results.

Keywords: cryopreservation, cholesterol, cyclodextrin, Pelibuey, Blackbelly, sheep semen

INTRODUCCIÓN

La importancia del manejo reproductivo en ovinos se ha convertido en una herramienta clave para el mejoramiento genético y la productividad de los rebaños. Obtener semen de alto valor genético permite heredar características a las crías de buena genética y elevar el número de crías en comparación con la monta natural. Además, las técnicas de congelación del material genético ofrecen la posibilidad de conservar genes valiosos por largos periodos de tiempo, sin que se vea afectada su viabilidad reproductiva (13).

El problema de la criopreservación se relaciona con que, aunque la criopreservación del semen y la inseminación artificial son biotecnologías muy usadas, en ovinos aún presentan limitaciones. La fertilidad se reduce debido a los daños que sufre la membrana plasmática durante la congelación y descongelación, afectando la movilidad, metabolismo y capacidad de supervivencia del espermatozoide dentro del aparato reproductor de la hembra. A nivel mundial, la criopreservación del semen es importante para conservar recursos genéticos, mantener diversidad biológica, transportar material genético de forma segura y evitar mover animales vivos (17).

El colesterol ciclodextrina (CLC), surge como una opción para ayudar al espermatozoide a resistir mejor la congelación. El CLC funciona como un pequeño “transportador” que lleva colesterol a la membrana del espermatozoide antes de congelarlo. Esto hace que la membrana sea más fuerte y flexible, ayudando a que soporte mejor los cambios de temperatura y reduciendo los daños durante la congelación y descongelación (3).

En Pastaza, una gran parte de la población depende de la agricultura y la ganadería, pero enfrenta limitaciones como poca información técnica, mal uso del suelo y falta de pagos estables para trabajadores rurales. En esta realidad, la crianza de ovinos de pelo como Pelibuey y Blackbelly es una opción productiva, pues se adaptan bien al clima tropical. Sin embargo, su desarrollo ha sido limitado por la falta de conocimientos en manejo y reproducción. (7).

La brecha de conocimiento aparece porque, aunque las razas Pelibuey y Blackbelly son muy buenas para el clima tropical y podrían ser una opción productiva en la región, su manejo reproductivo y sanitario aún no está bien estudiado. Por eso la producción ovina sigue siendo tradicional, sin aprovechar todo su potencial. También falta información sobre cómo el CLC puede ayudar a mejorar la calidad del semen congelado en estas razas (6).

La criopreservación del semen se ha posicionado a nivel mundial como una herramienta clave para conservar recursos genéticos, transportar material reproductivo de manera segura y reducir costos frente al movimiento de animales vivos, pero la región aún no aprovecha completamente estos beneficios (1).

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad espermática del semen de ovinos Pelibuey y Blackbelly utilizando diferentes concentraciones de ciclodextrina con colesterol y comparar la calidad seminal antes y después de la congelación, además de analizar los costos de cada tratamiento. Con este objetivo, se busca no solo conocer si el uso del CLC puede mejorar la calidad del semen, sino también ofrecer una opción accesible para los productores locales. La idea es que los resultados permitan contar con un método que mejore la reproducción, aumente la posibilidad de tener crías sanas y preserve el material genético sin necesidad de depender de técnicas costosas o difíciles de implementar.

La hipótesis de esta investigación propone que la adición del complejo colesterol ciclodextrina (CLC) al semen de ovinos Pelibuey y Blackbelly puede ayudar a mantener en mejores condiciones la membrana del espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación. Se considera que, al incorporar CLC antes de congelar, el colesterol que transporta puede ofrecer una protección a la estructura celular, lo cual se reflejaría en una mejor movilidad, mayor cantidad de espermatozoides vivos y menos alteraciones en su forma. Con esto se espera que el semen conservado pueda ser más útil y eficiente en los programas de reproducción ovina en la región amazónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Estación Experimental de Pastaza de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), ubicada en el kilómetro 34 de la vía Puyo–Macas, provincia de Pastaza, Ecuador. Esta zona se encuentra a una altitud de 1040 msnm. Durante las ocho semanas de duración del ensayo se efectuaron las fases de selección de los machos reproductores, acondicionamiento, extracción seminal, procesamiento en laboratorio y análisis de las variables pre y post congelación. El clima de la zona se caracteriza por una temperatura

promedio de 17 °C, una precipitación anual de 2233 mm y vientos de aproximadamente 6 km/h (12).

El estudio se desarrolló bajo un enfoque experimental con un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, se utilizaron los eyaculados de dos machos correspondientes a razas de ovinos de pelo (Pelibuey y Blackbelly) y cuatro niveles de ciclodextrina cargada de colesterol (CLC): 0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg por 120 millones de espermatozoides. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones evaluadas dando un total de 24 unidades experimentales (pajuelas) evaluadas al final del estudio. El análisis estadístico incluyó la media y la desviación estándar para las variables macroscópicas, la media para las microscópicas y, en las evaluaciones postcongelación, las pruebas de Tukey y Jollife según correspondió.

Los machos reproductores fueron seleccionados en base a los registros de producción y reproducción en donde se reflejaban que ambos ovinos tenían dos años de edad y se encontraban recibiendo una dieta de pasto Dalis (*Paspalum dilatatum*) y 0,5 kg de balanceado con 12% de proteína durante la investigación. Antes del inicio del estudio fueron desparasitados con albendazol al 25% y vitaminizados con vitaminas AD3E. Para la elaboración del complejo ciclodextrina-colesterol (CLC), se disolvieron 200 mg de colesterol en 1 mL de cloroformo y se mezclaron con una solución de 1 g de ciclodextrina en 2 mL de metanol. Ambas soluciones se homogeneizaron con un vórtex y se incubaron entre 24 y 48 horas a 37 °C en una caja Petri de vidrio. Posteriormente fueron extraídos los cristales del complejo con ayuda de vapores de nitrógeno líquido para su cristalización. Para la dilución seminal se utilizó el diluyente comercial Triladylr®.

La extracción del semen se hizo usando una vagina artificial que fue preparada y calentada previamente a 60 °C. Para que el carnero pudiera montar, se usaron ovejas que estaban en celo inducido con benzoato de estradiol. Una vez obtenido, el semen se revisó de inmediato para verificar su estado y luego fue llevado al laboratorio de reproducción animal de la Estación Experimental, donde se procesó para continuar con las siguientes etapas del estudio.

En la evaluación seminal se observaron los análisis macroscópicos y microscópicos. En el semen fresco se midió el volumen, el pH, el color y el aspecto. Con el microscopio se analizaron la motilidad masal, la motilidad individual, la vitalidad, la concentración espermática y morfología. La motilidad masal se observó con aumento de 10x y la individual con 40x. La vitalidad se revisó con la tinción eosina-nigrosina, que permite diferenciar espermatozoides vivos (cabeza clara) y muertos (cabeza teñida). La concentración se estimó usando una cámara de Neubauer con una dilución de 1:400 en agua destilada, y para ver la morfología se utilizó un aumento de 100x, registrando si existían cambios en la cabeza o en el flagelo.

El proceso de criopreservación abarcó varias etapas. Primero se realizó la pre-dilución del semen (1:1) con el diluyente a temperatura controlada. Posteriormente, las muestras fueron introducidas a temperatura ambiente (14–20 °C) por 45 minutos bajo luz ultravioleta. Luego, el semen se guardó en pajuelas de 0,25 cc, selladas con polvo polivinílico, y se sometió a una curva de temperatura controlada de 20 °C a 5 °C en 30 minutos, seguido por un enfriamiento a 4 °C durante 4 horas. La congelación final se realizó, mediante vapores de nitrógeno líquido,

reduciendo la temperatura de 4 °C a -6 °C en 10 minutos, y de -6 °C a -196 °C en 4 minutos, antes de sumergir completamente las pajuelas en nitrógeno líquido.

Después de descongelar las muestras de semen se volvieron a revisar las variables de motilidad individual, viabilidad, integridad de la membrana y morfología. Para saber si la membrana seguía funcionando bien se aplicó un test de hipoosmótica (HOST), que consiste en mezclar soluciones de fructosa con citrato de sodio. Los resultados se expresaron en porcentaje, indicando cuántos espermatozoides mantenían la membrana en buen estado. Se consideró que el semen era normal cuando más del 60 % de los espermatozoides tenían la cola enrollada, lo que mostró que su membrana seguía siendo funcional.

Para el semen fresco antes de congelar, en las variables macroscópicas como volumen y pH, se usó estadística descriptiva con media y desviación estándar. En las variables microscópicas del semen fresco, como la motilidad masal, motilidad individual, vitalidad, concentración espermática y morfología, se utilizó la media para describir los resultados. En cambio, para evaluar las muestras de semen congelado y luego descongelado, se realizó la separación de medias con la prueba de Tukey, usando un nivel de significancia de $p < 0,05$ para comparar los tratamientos analizados.

RESULTADOS

Valoración macroscópica del semen ovino pre-congelación

Se evaluaron las características macroscópicas del semen de ovinos de las razas Blackbelly y Pelibuey antes de la congelación, considerando variables como volumen, pH, aspecto, color y olor.

Tabla 1. Valoración macroscópica de semen fresco de las razas Blackbelly y Pelibuey pre-congelación.

Volumen						
Estadísticas descriptivas	Raza	eyaculado (mL)	pH	Aspecto	Color	Olor
Media	BB*	1,35	6,6	Normal	Blanco cremoso	Neutro
Desviación estándar	BB*	0,070	0,14			
Media	PB*	1,6	6,65	Normal	Blanco cremoso	Neutro
Desviación estándar	PB*	0,282	0,21			

Nota: *BB: Blackbelly; *PB: Pelibuey

El semen de los machos Blackbelly presentó un volumen promedio de 1,35 mL ($\pm 0,070$), mientras que los machos Pelibuey registraron 1,60 mL ($\pm 0,282$). Los valores de pH se encontraron dentro del rango normal, con 6,6 ($\pm 0,14$) para Blackbelly y 6,65 ($\pm 0,21$) para

Pelibuey. En ambas razas el semen presentó un color blanco cremoso, aspecto normal y olor neutro, lo cual refleja que los animales se encontraban sanos y sin infecciones que pudieran alterar la calidad del eyaculado. En general, estas características muestran que las dos razas tienen un buen potencial reproductivo.

Valoración microscópica del semen ovino pre-congelación

Se evaluaron las características microscópicas del semen de ovinos de las razas Blackbelly y Pelibuey antes de la congelación, considerando variables como motilidad masal, motilidad individual, vitalidad, concentración espermática y morfoanomalías.

Tabla 2. Valoración microscópica de semen fresco de las razas Blackbelly y Pelibuey pre-congelación.

Macho	Motilidad masal (puntos)	Motilidad individual (%)	Vitalidad (%)	Concentración Espermática (Millones De Spz/mL)	Morfoanomalías (%)
BB	3	72,5	70	1800	70
PB	4	87,5	80	3700	80

Nota: *BB: Blackbelly; *PB: Pelibuey

En los resultados del semen fresco se observó que los carneros Pelibuey mostraron mejores valores en comparación con los Blackbelly. La motilidad masal fue de 3 puntos en Blackbelly y 4 puntos en Pelibuey, y la motilidad individual alcanzó 72,5 % en Blackbelly y 87,5 % en Pelibuey. La vitalidad también fue mayor en Pelibuey con un 80 %, mientras que Blackbelly registró 70 %. La concentración espermática fue bastante diferente entre razas, con 1800 millones de espermatozoides/mL en Blackbelly y 3700 millones/mL en Pelibuey. En el caso de las morfoanomalías, Blackbelly presentó 70 % y Pelibuey 80 %, por lo que ambas mostraron presencia de espermatozoides con alguna alteración. Estas diferencias podrían deberse a factores naturales como la edad, la condición corporal o la adaptación de cada raza al clima tropical, ya que Pelibuey suele presentar mejor respuesta reproductiva en zonas cálidas. Sin embargo, en general, ambas razas mostraron resultados funcionales y adecuados para procesos de reproducción asistida.

Valoración post-congelación con Ciclodextrina Cargada de Colesterol (CLC)

Para evaluar los efectos de la adición de Ciclodextrina Cargada de Colesterol (CLC) en el semen ovino de las razas Blackbelly y Pelibuey, se analizaron variables como motilidad individual, viabilidad espermática, integridad de la membrana y morfología. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valoración del semen ovino de la raza Blackbelly Pelibuey post congelación aplicando CLC.

Variable	Raza BB	Raza PB	E.E	Prob	Sig
Motilidad individual (%)	49,17 (T0) A				
	31,67 (T1) A	34,17 (T0) A 11,67 (T1) A 11,67 (T2) A	4,51	0,09	NS
	15,8 (T2) A				
	17,5 (T3) A	20 (T3) A			
Viabilidad (%)	53,33 (T0) A				
	30,83 (T1) A	39,17 (T0) A 11,67 (T1) A 10,83 (T2) A 20 (T3) A	5,99	0,3	NS
	15 (T2) A				
	17,5 (T3) A				
Integridad de la membrana (%)	18 (T0) CD				
	38,33 (T1) A	11,33 (T0) D 25,67 (T1) BC 27,67 (T2) B 18,67 (T3) CD	1,8	0,007	*
	25,7 (T2) BC				
	22,33 (T3) BC				
Morfología (%)	15,33 (T0) A	17,33 (T0) A			
	18,33 (T1) A	16 (T1) A			
	16,3 (T2) A	14 (T2) A	2,26	0,56	NS
	17,67 (T3) A	13,33 (T3) A			

Nota: *BB: Blackbelly; *PB: Pelibuey; E.E: Error experimental; Prob: Probabilidad; >0,05: no es significativo; <0,05: es significativo; Sig: Significancia

En la raza Blackbelly no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) en la motilidad individual entre tratamientos. El valor más bajo correspondió al T2, con 15,8 %, cuando se adicionó 1 mg de CLC, mientras que el más alto se registró en el T0 con 49,17 %, correspondiente al semen sin adición del complejo. Esta diferencia podría deberse a que esta raza, por su adaptación al clima tropical y su genética, quizá no responde de la misma manera a la adición de colesterol, ya que sus espermatozoides podrían tener una membrana naturalmente más estable y resistente. La Figura 1 muestra la tendencia cuadrática obtenida mediante el análisis de regresión, donde el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,81$) indicó que

el 81 % de la variación en la motilidad individual estuvo explicada por los niveles de CLC empleados.

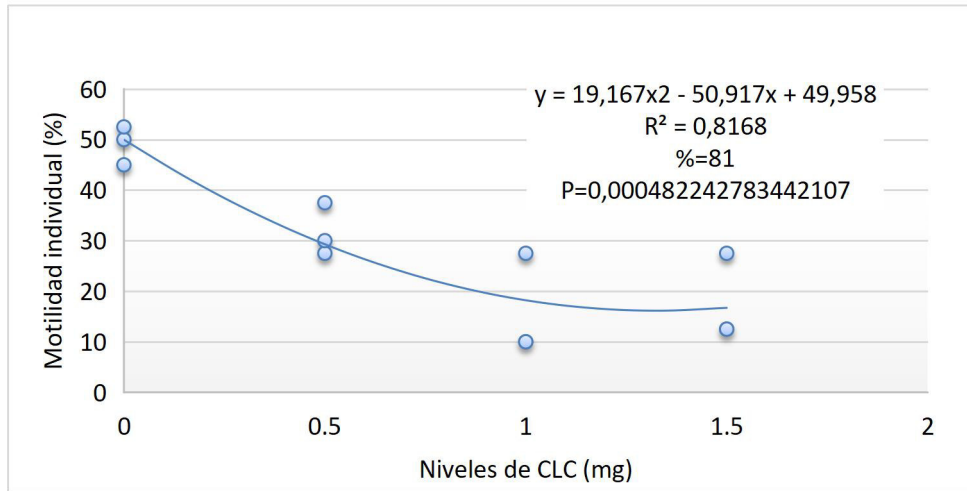


Figura 1. Regresión de la motilidad individual de semen criopreservado con CLC en machos de raza Blackbelly.

Fuente: Mullo, Sandra (2023).

En la raza Pelibuey tampoco se detectaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$). en la motilidad individual entre tratamientos. El menor valor se presentó en los tratamientos T1 y T2 con 11,67 %, mientras que el valor más alto correspondió al T0 con 34,17 %. Esta diferencia puede tener sentido si consideramos que el Pelibuey es una raza que suele tener buena adaptación al clima tropical y, por lo tanto, su semen puede responder de manera más estable sin necesidad de agregar compuestos como el CLC. La Figura 2 ilustra el modelo de regresión obtenido, el cual evidenció una tendencia cuadrática con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,63$, lo que sugiere que los niveles de CLC explicaron el 63 % de la variabilidad de la motilidad individual.

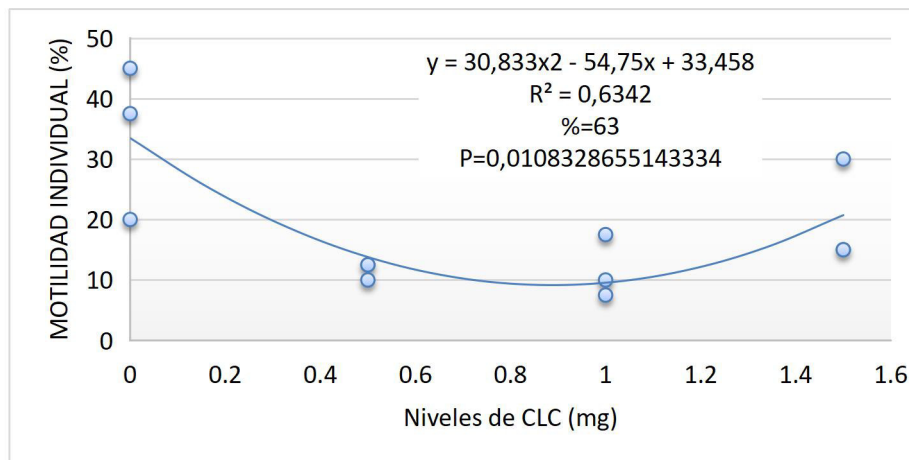


Figura 2. Regresión de la motilidad individual de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.

Fuente: Mullo, Sandra (2023).

En cuanto a la viabilidad espermática, en la raza Blackbelly no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$). El valor más bajo se registró en el tratamiento T2 con 15 %, correspondiente a la concentración de 1 mg de CLC, mientras que el valor más alto fue de 53,33 % en T0 (0 mg de CLC). Estos resultados pueden deberse a que los Blackbelly, aunque son animales adaptados al clima tropical, suelen tener una respuesta más sensible cuando se altera o cambia el manejo del semen antes de congelarlo. La Figura 3 representa el modelo de regresión obtenido, donde se determinó una tendencia cuadrática con un coeficiente de determinación ($R^2 = 0,80$), lo cual indica que el 80 % de la variación en la viabilidad dependió de los niveles de CLC empleados.

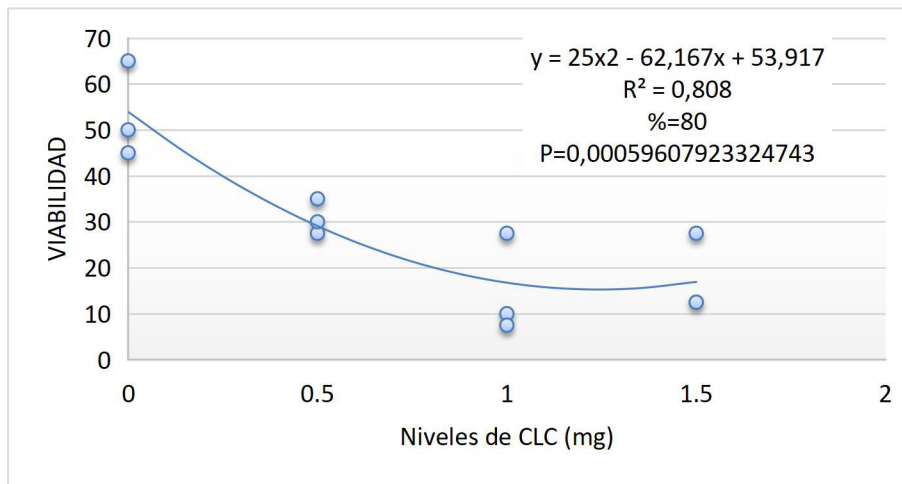


Figura 3. Regresión de la viabilidad de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.

Fuente: Mullo, Sandra (2023).

En la raza Pelibuey, de igual forma, no se identificaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$). El menor valor se presentó en T2 con 10,83 %, mientras que el valor más alto se observó en T0 con 39,17 %. Esto puede deberse a que los espermatozoides de Blackbelly ya están acostumbrados a las condiciones del clima tropical y podrían tener una membrana más resistente de forma natural. La Figura 4 muestra el análisis de regresión, cuyos datos evidenciaron un ajuste cuadrático con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,57$, indicando que el 57 % de la variabilidad en la viabilidad fue atribuida a los niveles del complejo.

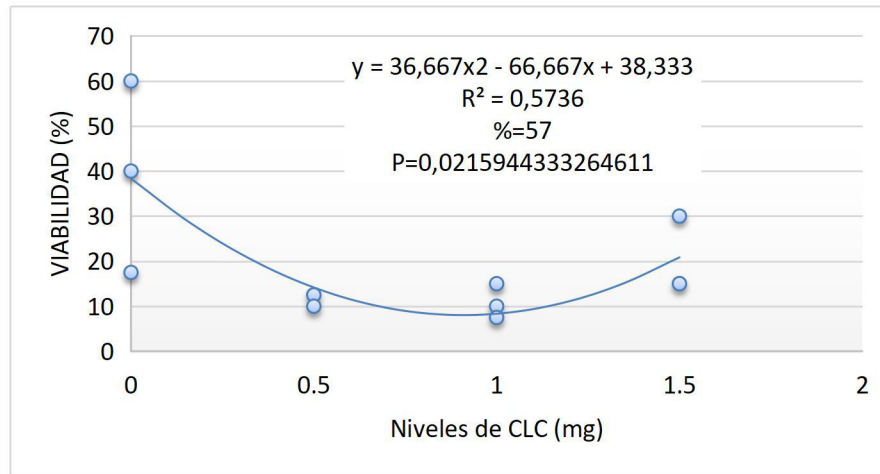


Figura 4. Regresión de la viabilidad espermática de semen criopreservado con CLC en machos Pelibuey.

Fuente: Mullo, Sandra (2023).

Los resultados obtenidos para la integridad de la membrana mostraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) en ambas razas. En la raza Blackbelly, el valor más bajo se obtuvo en el tratamiento T0 con 18 %, y el mayor en T1 con 38,33 %, correspondiente a una concentración de 0,05 mg de CLC. Esto podría deberse a que el CLC ayuda a la membrana a ser más resistente a los cambios bruscos de temperatura durante la congelación. El análisis de regresión reveló una tendencia cuadrática, donde el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,82$) indicó que el 82 % de la variación estuvo explicada por los niveles del complejo. En la Figura 5 se observa un incremento en la integridad de la membrana hasta la concentración intermedia, seguido de una disminución en dosis más altas, lo que evidencia un punto óptimo de respuesta biológica.

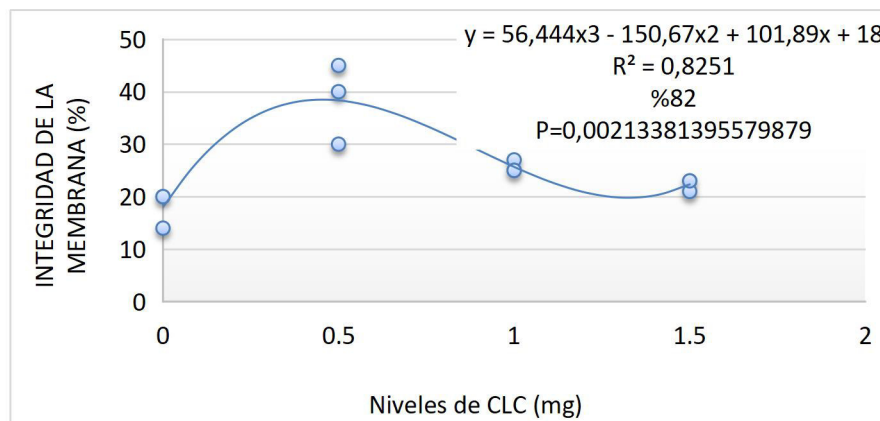


Figura 5. Regresión de la Integridad de la membrana de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.

Fuente: Mullo, Sandra (2023).

En la raza Pelibuey también se evidenciaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$). El valor más bajo correspondió al tratamiento T0 con 11,33 % y el más alto al T2 con 27,67 %. La Figura 6 muestra el modelo cuadrático mostró un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,98$, lo cual demuestra una estrecha relación entre la integridad de la membrana y la cantidad de CLC utilizada. Esta mejora puede explicarse porque el CLC aporta mayor estabilidad a la membrana del espermatozoide, ayudándolo a soportar mejor el proceso de congelar y descongelar. Además, los ovinos Pelibuey suelen adaptarse mejor a climas tropicales y podrían responder de manera más positiva al uso de este compuesto, lo que favorece la protección de sus células reproductivas durante el proceso de criopreservación.

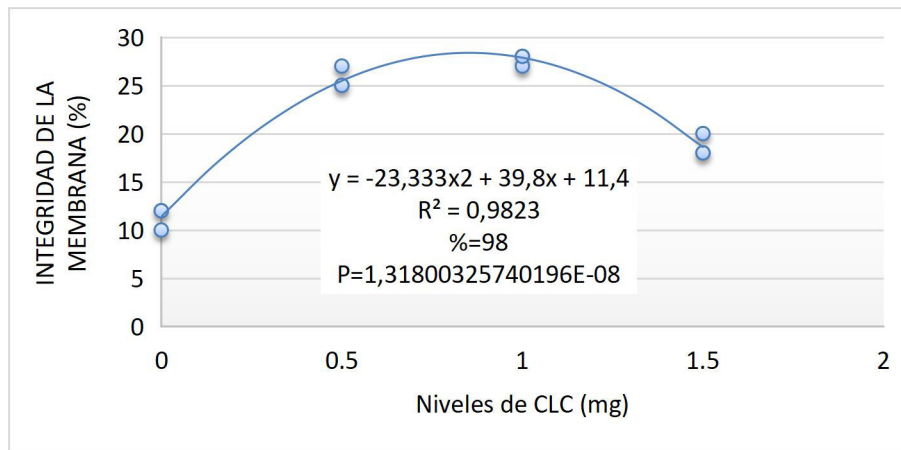


Figura 6. Regresión de la Integridad de la membrana de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.

Fuente: Mullo, Sandra (2023).

Finalmente, en la evaluación de morfoanomalías no se detectaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) en ninguna de las razas. En los machos Blackbelly, el menor valor fue 16,3 % en T2 (1 mg de CLC) y el mayor 18,33 % en T1 (0,05 mg de CLC). En los machos Pelibuey, el valor mínimo fue 14 % en T2 y el máximo 17,33 % en T0. Esto puede deberse a que las alteraciones morfológicas generalmente están relacionadas con factores como la genética, la alimentación, el manejo diario, el estrés o incluso la edad del animal, y no tanto con el proceso de congelación o los niveles de CLC aplicados.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la valoración macroscópica del semen de ovino de las razas Blackbelly y Pelibuey pre-congelación muestran características normales en cuanto a aspecto, color, olor y pH, lo cual indica la salud y buen estado reproductivo de los animales analizados. Estos hallazgos coinciden con los reportes (4) y (9), quienes señalan que un color blanco cremoso y un olor neutro representan semen apto para su manipulación y criopreservación. Los resultados expuestos para la variable de olor de semen del macho raza Pelibuey y Blackbelly

presentaron un olor neutro, (14) menciona que las características macroscópicas como el color y olor del semen deben ser inspeccionados lo más rápido posible después de recogido el semen. El olor debe ser característico de cada especie y animal y por lo particular no debe ser muy fuerte. Por otro lado (20) indica en su investigación sobre congelación de semen de ovino que el olor del carnero es normal, neutro e inodoro, características similares a la presente investigación.

En relación con el volumen del eyaculado, los valores de 1,35 ml para Blackbelly y 1,6 ml para Pelibuey se encuentran dentro del rango deseado de 0,7 a 3 ml según (5). Estos datos indican que los animales poseen una capacidad seminal adecuada. A pesar de los valores reportados (16) obtuvo eyaculados de 0.5 a 2.0 mL existiendo una variación debido a la edad, tamaño, condición corporal de los animales seleccionados en su investigación.

La valoración microscópica pre-congelación mostro una motilidad masal de 3 y 4 puntos para Blackbelly y Pelibuey, respectivamente, demostrando que los eyaculados son suficientemente móviles según la escala descrita por (5). De igual manera, la motilidad individual (72,5% y 87,5%) y la vitalidad (70% y 80%) se encuentran en un rango bueno, confirmando que una concentración espermática activa se encuentra disponible para la criopreservación, según (11), la motilidad individual de semen en ovinos se evalúa de 80-100% muy bueno, 60-80% bueno, 40-60% media, 20-40% pobre y 0-20% mala. Al respecto (10) señala como característica seminal acerca de la motilidad individual de ovinos de pelo es de un 87.7 ± 4.6 %. La concentración espermática también fue consistente con los valores reportados por (8), lo que respalda la uniformidad de la calidad seminal entre animales de distintas edades y condiciones. Las morfoanomalías observadas (70% y 80%) fueron inferiores a las reportadas por (2), lo que evidencia un manejo adecuado de los reproductores.

Tras la criopreservación con Ciclodextrina Cargada de Colesterol (CLC), la motilidad individual y la viabilidad no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$), aunque se observó una tendencia a la disminución de estas variables con el incremento del CLC, especialmente en los niveles de 1 y 1,5 mg. La regresión cuadrática indicó que gran parte de la variabilidad (81% en Blackbelly y 63% en Pelibuey para motilidad individual; 80% y 57% para viabilidad) se explica por los niveles de CLC, mientras que el resto corresponde a factores no considerados. Estos hallazgos concuerdan con (18), quien menciona que el colesterol en la membrana protege a los espermatozoides del estrés osmótico y mejora su tolerancia a la congelación, aunque los efectos dependen del tipo de diluyente y crioprotector empleado.

La integridad de la membrana presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Esto muestra que el CLC realmente ayuda a proteger la membrana del espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación. Los resultados mostraron una relación clara entre la cantidad de CLC usada y el estado de la membrana, con un R^2 de 82% en Blackbelly y un R^2 de 98% en Pelibuey, lo que indica que la respuesta fue bastante precisa. Estos resultados coinciden con (19), quienes reportan que el colesterol ayuda a que la membrana sea más fuerte y flexible, lo que le permite soportar mejor los cambios bruscos de temperatura. De esta forma, el espermatozoide conserva su estructura y puede funcionar mejor después del proceso de congelación.

Respecto a las morfoanomalías postcongelación, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, indicando que los distintos niveles de CLC no incrementan las anomalías espermáticas de manera considerable. Estos resultados son similares a los reportados por (15), aunque los porcentajes pueden variar según edad de los animales, condiciones ambientales y composición del diluyente.

En conjunto, los hallazgos indican que los tratamientos con CLC no afectan negativamente las características macroscópicas ni microscópicas del semen ovino pre-congelación y post-congelación, garantizando una calidad espermática adecuada para la criopreservación y proporcionando información relevante sobre los costos asociados, lo que constituye un aporte innovador al manejo reproductivo de ovinos Blackbelly y Pelibuey en el trópico ecuatoriano.

CONCLUSIONES

La criopreservación del semen ovino de las razas Pelibuey y Blackbelly utilizando distintos niveles de ciclodextrina cargada de colesterol (0, 0,5, 1 y 1,5 mg/120 millones de espermatozoides) mostró ser efectiva para mantener la calidad espermática. Los resultados indicaron que, antes de la congelación, el semen presentaba un aspecto normal, color blanco cremoso, olor neutro, pH promedio de 6,6, y volúmenes de eyaculado de 1,35 ml para Blackbelly y 1,6 ml para Pelibuey. Microscópicamente, la motilidad masal fue de 3 y 4 puntos, la motilidad individual de 72,5% y 87,5%, la vitalidad de 70% y 80%, la concentración espermática de $1,8 \times 10^9$ y $3,7 \times 10^9$ espermatozoides/ml, y las morfoanomalías de 70% y 80%, respectivamente, demostrando que las muestras eran aptas para la criopreservación.

Tras la congelación, la aplicación de CLC no produjo diferencias estadísticas significativas en motilidad individual, viabilidad ni morfoanomalías entre los tratamientos, pero sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en la integridad de la membrana, alcanzando un 38,33% en la raza Blackbelly con la adición de 0,5 mg de CLC y un 27,67% en la raza Pelibuey con la adición de 1 mg de CLC, lo que indica que la adición del complejo ciclodextrina - colesterol contribuye a proteger la membrana plasmática de los espermatozoides frente al estrés del proceso criogénico. Estos resultados evidencian que los niveles de CLC empleados permiten mantener la funcionalidad espermática y la aptitud de las muestras para futuros procesos de reproducción asistida.

AGRADECIMIENTOS (OPCIONAL)

Un especial agradecimiento a todos los miembros del Proyecto de Investigación PROPEA (IDIPI-262) de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH quienes contribuyeron al desarrollo del presente trabajo investigativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araya-Zúñiga I, Sevilla F, González JA, Matamoros K, Valverde A. Cryopreservation of livestock species germplasm: A step towards sustainability [Internet]. *Agronomía Mesoamericana*;36(1): Article 61375. e- ISSN 2215- 3608. Available from: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v36n1/2215- 3608- am- 36- 01- 61375.pdf>
2. Carvajal-Serna M, Cortés-López HA, Manrique-Perdomo C, Grajales-Lombana HA. Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Rev Med Vet*. 2018;(36):49-61. doi:10.19052/mv.5171. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6229141>.
3. Castillo LA, Páucar E, Alvarado E. Adición de metil-β-ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero. *Rev Investig Vet Perú [Internet]*. 2019 Dec 23 [cited 2022 Oct 17];30(4):1637-44. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172019000400025&script=sci_arttext&lng=pt.
4. Castro J, Rodríguez A, Rivas D. Calidad del semen refrigerado de carneros Assaf y Blackbelly. *Rev Investig Vet Perú*. 2018;29(2):785-92. doi:10.15381/rivep.v29i2.14598. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172017000300032&script=sci_abstract.
5. Cueto MI, Fernández E, Abecia JA. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. *INTA Ediciones*; 2018. Vol II, p. 323. ISBN 978-987-521-859-7. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/obtencion-procesamiento-y-conservacion-del-semen-ovino>.
6. Fonseca KJM. Caracterización del fenotipo en dos razas de ovejas de pelo adaptadas al trópico húmedo amazónico, Pelibuey y Blackbelly [Internet]. *Ciencia Latina: Revista Científica Multidisciplinar*. 2023 Jul-Aug [citado 2024 Jul 12];7(4):1880–[citado página final]. Disponible en: <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/7017/10662>
7. Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de Pastaza. PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PROVINCIA DE PASTAZA: Actualización 2019 [Internet]. Puyo, Ecuador: GADPPz; 2019 [citado 2024 Jul 12]. Disponible en: https://pastaza.gob.ec/leytransparencia/rendicion_cuentas/2021/pdot_prov_pastaza_act_ualizacion_2019.pdf
8. Gómez J, Díaz L, Hernández R. Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de Guerrero en el LAPROSEM-UAgro. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2019;10(4):1081-92. doi:10.22319/rmcp.v10i4.4934. Disponible en: <http://200.4.142.40:8080/handle/uagro/1384>
9. Gómez M, Pérez J, Cordero R. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*; 2018. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>
10. Guerrero W. Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino [tesis de maestría]. Lima (Perú): Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria; 2009. Vol 1: 14 p.

11. Hernández C, Morales L, Bravo G. Evaluación de la concepción en cabras utilizando semen criopreservado. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2020.
12. INAMHI, ESPOCH. Pronóstico del tiempo para el 20 y 21 de agosto del 2024. Emisión diaria. Convenio ESPOCH_INAMHI Oficina Regional de Pronóstico [Internet]. [cited 2024 Jul 12]. Available from: https://www.esPOCH.edu.ec/wp-content/uploads/2025/02/Pronostico-del-tiempo-para-el-20-y-21-de-agosto-del-2024.-EMISION-DIARIA.-Convenio-ESPOCH_INAMHI_Oficina-Regional-de-Pronostico.pdf
13. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. *Boletín Técnico* [Internet]. 2018 Aug 23 [cited 2024 Jul 22].
14. Mejía A. Manual para la explotación de ovinos de pelo en México [tesis de licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia en Internet]. Guadalajara (México): Universidad de Guadalajara, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 1998 [citado 2024 Jul 11].
15. Pozo A, Huamán E. Características seminales de ovino pre y post congelamiento usando dilutor comercial y diferentes yemas de huevo. Huamanga, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2019. Disponible en: <https://revistas.unsch.edu.pe/index.php/investigacion/article/view/99>
16. Ramírez M, Ugalde R, Aguilar E. Calidad seminal de ovinos de pelo suplementados con *Moringa oleifera* (Moringaceae) y *Trichanthera gigantea* (Acanthaceae). *Rev Biociencias* [Internet]. 2020 [citado 2024 Jul 22];11(2):1-8. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7576407>
17. Ruiz L, Gómez C, Cayo J. Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores. *Rev Investig Vet Perú*. 2015 Sep 2;26(1):47-54. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172015000100007&script=sci_arttext&tIng=pt
18. Salmon VM, Ponce M, Mora N. Cholesterol-loaded cyclodextrin increases the cholesterol content of goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation. *Biol Reprod*. 2016;95(3):1-12. doi:10.1095/biolreprod.116.142943. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/94/4/85,%201-12/2434434>
19. Souza F, Torres C, Pacheco D. Adição de colesterol carregado com ciclodextrina ao semen ovino na criopreservação. *Rev Bras Reprod Anim*. 2021;31(1):49-56. Disponible en: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9388/7569>
20. Zamora R. Efecto del antioxidante fucoxantina sobre la congelación de semen de ovino [tesis de maestría]. Conkal (México): Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal; 2021 [citado 2024 Jul 10].