

# EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON NANOCOMPLEJOS DE COLESTEROL-METIL-B-CICLODEXTRINA EN LA CALIDAD SEMINAL OVINA

## EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH CHOLESTEROL-METHYL-B-CYCLODEXTRIN NANOCOMPLEXES ON SEMEN QUALITY

José Luis Requena Lozano<sup>1</sup>, Marlon Sebastián Rivadeneira Romero<sup>2</sup>, Manuel Esteban Maldonado Cornejo<sup>3</sup>, Juan Carlos Alvarado Alvarado<sup>4</sup>, Andrés Leonardo Moscoso Piedra<sup>5</sup>

{jose.requena.74@est.ucacue.edu.ec<sup>1</sup>, marlon.rivadeneira.14@est.ucacue.edu.ec<sup>2</sup>, mmaldonadoc@ucacue.edu.ec<sup>3</sup>, jalvaradoa@ucacue.edu.ec<sup>4</sup>, amoscop@ucacue.edu.ec<sup>5</sup>}

Fecha de recepción: 15/08/2026 / Fecha de aceptación: 08/10/2026 / Fecha de publicación: 14/10/2026

**RESUMEN:** La criopreservación de semen constituye una biotecnología para la conservación de recursos genéticos ovinos, donde las fases críticas de congelación y descongelación inducen un severo estrés oxidativo (EO) y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando alteraciones irreversibles en la arquitectura lipídica de la membrana plasmática espermática, debido a su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y baja concentración endógena de colesterol propia de la especie. Para mitigar este daño, la adición de nanocomplejos de colesterol-metil-β-ciclodextrina (CLC) en los diluyentes comerciales representa una alternativa para preservar la viabilidad celular. Esta investigación determinó el efecto de CLC en sustitución de la yema de huevo dentro del diluyente Triladyl, evaluando su impacto sobre la calidad espermática post-descongelación. Se recolectaron cinco eyaculados de un carnero de la raza Katahdin, ajustándose a una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides por dosis. Las muestras se dividieron en cuatro grupos: uno de control y tres tratamientos suplementados con 1 mg, 2 mg y 3 mg de CLC. Tras la criopreservación, el semen fue evaluado mediante el sistema CASA, tinción de Eosina-Nigrosina, el test HOST y la fluorescencia MitoTracker Green. Los resultados evidenciaron que la suplementación con 1 mg de CLC brindó una protección superior a la membrana espermática, además de proteger la

<sup>1</sup>Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca – Ecuador, <https://orcid.org/0009-0009-8860-3693>; +593997639542

<sup>2</sup>Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca – Ecuador, <https://orcid.org/0009-0000-4548-9186>; +593991286898

<sup>3</sup>Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca – Ecuador, <https://orcid.org/0000-0002-7240-179X>; +593999023022

<sup>4</sup>Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca – Ecuador, <https://orcid.org/0000-0002-1507-2280>; +593999388991

<sup>5</sup>Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca – Ecuador, <https://orcid.org/0000-0002-4017-0165>; +593984688499

actividad mitocondrial, mejorando así su integridad funcional, mientras la progresividad sufrió alteraciones, se mantuvo estable respecto al control. Se concluye que el uso de nanocomplejos de CLC optimiza la criopreservación seminal ovina, ofreciendo una alternativa biosegura frente al uso de yemas de huevo.

**Palabras clave:** *colesterol-metil-β-ciclodextrina (CLC), criopreservación, semen ovino, estrés oxidativo, calidad espermática*

**ABSTRACT:** Cryopreservation of sheep semen constitutes an essential livestock biotechnology for the conservation and dissemination of genetic resources of high zootechnical value within sustainable production systems. However, the critical phases of thermal descent, freezing, and thawing induce severe oxidative stress (EO) and the accumulation of reactive oxygen species (ROS), triggering irreversible alterations in the lipid architecture of the sperm plasma membrane due to its high proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and low endogenous cholesterol concentration. To mitigate this cryogenic damage, the addition of methyl-β-cyclodextrin-cholesterol nanocomplexes (CLC) in commercial diluents represents a superior biotechnological alternative to stabilize the membrane and preserve cell viability. The purpose of this research was to determine the optimal concentration of (CLC) as a substitute for egg yolk within the Triladyl diluent, evaluating its impact on post-thaw sperm quality. Five ejaculates from a Katahdin ram were collected using an artificial vagina, adjusted to a concentration of  $50 \times 10^6$  sperm per dose. The samples were divided into four groups: one control and three treatments supplemented with 1 mg, 2 mg, and 3 mg of (CLC). After cryopreservation in liquid nitrogen, the semen was evaluated using the computerized CASA system, Eosin-Nigrosin staining, the HOST test, and the fluorescent probe MitoTracker Green. The results showed that supplementation with 1 mg of (CLC) provided superior protection to the sperm membrane against osmotic and thermal variations, significantly improving its functional integrity and flagellar beat frequency, while the parameters of overall viability and mitochondrial activity remained stable compared to the control. It is concluded that the use of (CLC) nanocomplexes optimizes ovine semen cryopreservation, offering a biosecure alternative to the use of avian-origin yolks.

**Keywords:** *methyl-β-cyclodextrin-cholesterol (CLC), cryopreservation, ovine semen, oxidative stress, sperm quality*

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen es una de las principales biotecnologías reproductivas implementadas para la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético y la difusión de material reproductivo de alto valor mediante programas de inseminación artificial. Su aplicación ha permitido preservar el material genético de sementales sobresalientes, lo que ha contribuido al incremento de la eficiencia reproductiva de los sistemas de producción ovina. Sin embargo, el éxito de esta técnica depende en gran medida de la capacidad de los espermatozoides para mantener su funcionalidad después de los procesos de congelación y descongelación, los cuales

generan alteraciones estructurales y metabólicas lo que consecuentemente considerablemente la fertilidad y viabilidad del semen criopreservado (1,2).

Los espermatozoides poseen una limitada capacidad antioxidante y reducida cantidad de citoplasma, motivos por los cuales resultan altamente susceptibles al daño oxidativo ocasionado durante el proceso de congelación y descongelación. Por su parte, durante el proceso de criopreservación los espermatozoides son sometidos a cambios extremos de temperatura y presión osmótica que modifican la organización de los fosfolípidos de la membrana plasmática, contribuyendo a la formación de cristales de hielo y aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En consecuencia, estas alteraciones desencadenan estrés oxidativo, peroxidación lipídica, al igual que alteraciones en las proteínas, mitocondrias, ADN espermático y consecuentemente la disminución de la motilidad, viabilidad, integridad de membrana y la capacidad fecundante de las células espermáticas (3,4).

Por su parte, uno de los principales factores predisponentes de la susceptibilidad espermática, en comparación con otros animales domésticos, radica en la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide al igual que presenta una menor relación entre el colesterol y los fosfolípidos tomando en consideración su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, características de esta especie, que incrementan la fluidez de la membrana y reducen su estabilidad frente al choque térmico. En este sentido la supervivencia celular, posterior a la descongelación, depende del proceso de criopreservación proceso donde ocurre una pérdida progresiva de colesterol, lo que favorece a la formación de poros e incrementa la permeabilidad celular, facilitando la afluencia anómala de calcio, los procesos de criocapacitación y reacción acrosomal prematura (5).

Durante los últimos años se han desarrollado diversas técnicas relacionadas con la estabilización de la membrana plasmática antes del proceso de congelación. Entre aquellos hallazgos data la utilización de nanocomplejos de colesterol-metil- $\beta$ -ciclodextrina (CLC) debido a su capacidad para transportar colesterol hacia la bicapa lipídica del espermatozoide. Por su parte, el colesterol-metil- $\beta$ -ciclodextrina se caracteriza por su una cavidad hidrofóbica que permite encapsular moléculas lipofílicas como el colesterol y transferirlas eficientemente hacia la membrana celular. Por consiguiente, la estabilidad estructural de la membrana aumenta, reduce la extracción de colesterol durante el enfriamiento y mejora la resistencia de los espermatozoides frente al estrés térmico y osmótico de la criopreservación (6).

Previas investigaciones realizadas en diferentes especies domésticas han demostrado que la suplementación con complejos colesterol-ciclodextrina incrementa significativamente la criotolerancia espermática. Tomando en consideración que el uso de colesterol mediante estos nanocomplejos mejora la estabilidad de la membrana plasmática, disminuye el daño oxidativo, y a su vez preservando el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ATP necesaria para el movimiento flagelar. Brindando así mejoras significativas en parámetros relacionados con la motilidad total, motilidad progresiva, integridad de membrana, viabilidad celular y funcionalidad mitocondrial tras de su descongelación. De igual manera, estudios previos evidencian mejoras en aquellos sementales clasificados como "malos congeladores", cuya calidad seminal se ve comprometida durante la criopreservación (7).

En lo que concierne al desarrollo de softwares, el Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA), ha optimizado el proceso de evaluación de los parámetros mencionados, al igual que la precisión relacionada con el análisis de la motilidad y la cinética espermática, reduciendo así la variabilidad inherente frente a las evaluaciones subjetivas. Por su parte, el uso de las pruebas funcionales como la tinción de eosina-nigrosina, el test hiposmótico (HOST) y la utilización de sondas fluorescentes como MitoTracker Green permiten valorar la viabilidad celular, la funcionalidad de la membrana plasmática y el potencial metabólico mitocondrial, proporcionando así una evaluación integral de la calidad seminal post-descongelación (8).

Por otra parte, es indispensable resaltar que la variabilidad con respecto a las concentraciones óptimas de colesterol-metil- $\beta$ -ciclodextrina utilizadas en los protocolos de criopreservación influenciadas principalmente por factores predisponentes como son: la raza, el diluyente empleado, la concentración espermática, las condiciones ambientales, al igual que el tiempo de incubación previo a la congelación, lo cual altera la respuesta de los espermatozoides a la suplementación lipídica. En este sentido, aún no se han determinado protocolos universales que garanticen la calidad seminal post – descongelación en ovinos bajo condiciones de producción y laboratorio empleadas en Ecuador (9).

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de tres dosis de complejos de colesterol–metil- $\beta$ -ciclodextrina como sustituto de la yema de huevo en el diluyente Triladyl sobre la calidad seminal posdescongelación en ovinos, mediante el análisis de la motilidad, la cinética espermática, la viabilidad celular y la funcionalidad de la membrana plasmática.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, ubicado en el cantón Cuenca, provincia del Azuay, Ecuador. Para el estudio se hizo uso de semen de un carnero macho de raza Kathadin, de tres años de edad y fertilidad comprobada, mantenido bajo un modelo de producción intensivo. La alimentación del ejemplar se basó en un sistema de ración total mezclada (TMR, por sus siglas en inglés: Total Mixed Ration), lo que garantizó el suministro balanceado de los requerimientos nutricionales durante el período experimental.

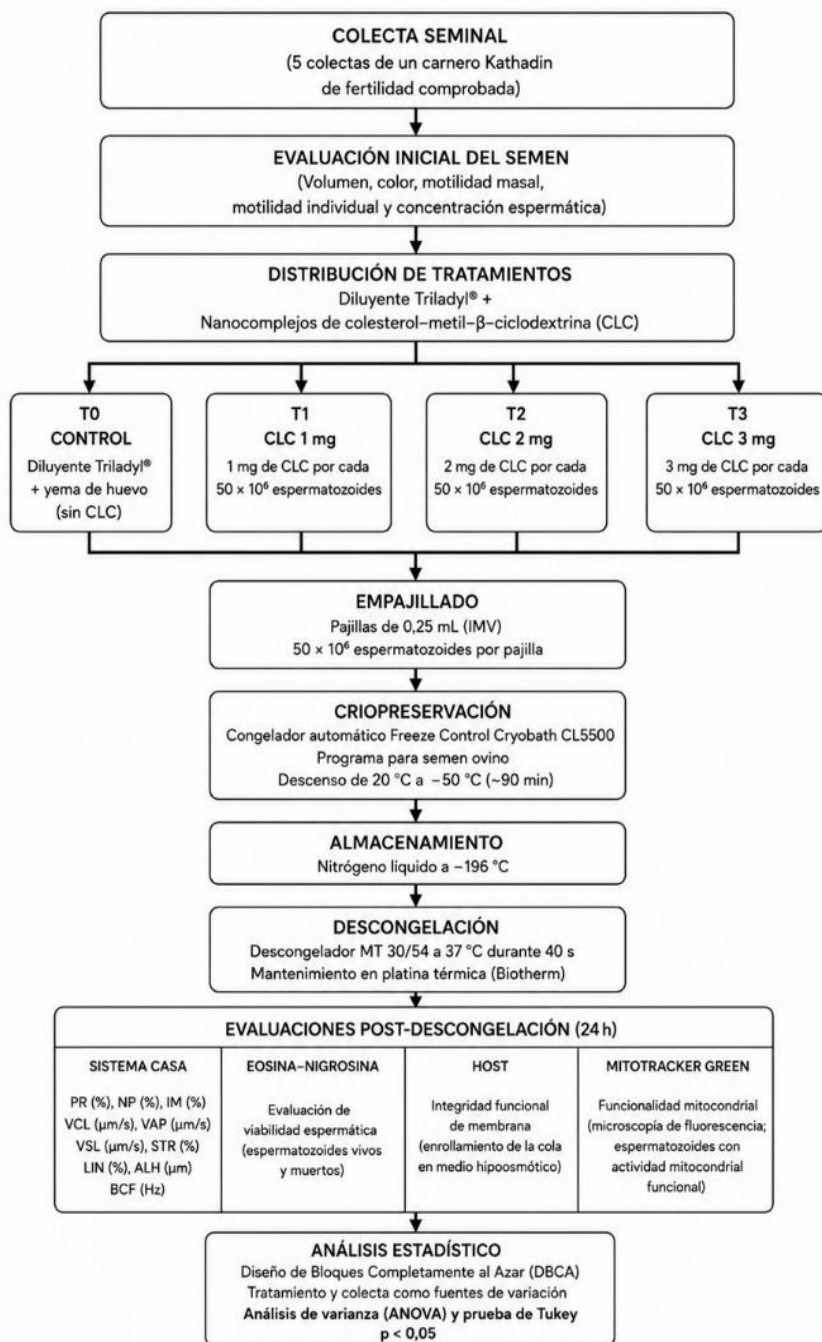


Figura 1. Diseño de la investigación.

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la suplementación con nanocomplejos de colesterol-metil-β-ciclodextrina (CLC) sobre la calidad seminal post-descongelación en ovinos, empleando como tratamiento testigo un diluyente convencional a base de Triladyl y yema de huevo. En este contexto, se utilizó semen de un carnero Katahdin de tres años, procedente de la granja Gañanzol de la Universidad Católica de Cuenca, con un peso aproximado de 100 kg y

condición corporal de 3,5/5. Se realizaron cinco colectas mediante un diseño de bloques completos al azar (DBCA), considerando cada colecta como bloque. Cada eyaculado se dividió en cuatro fracciones asignadas aleatoriamente a los tratamientos. Cada fracción constituyó una unidad experimental, para un total de 20. Se evaluó una pajuela por tratamiento y colecta, sumando 20 pajuelas.

Por su parte, la metodología comprendió las fases de campo y laboratorio (figura 1). El semen se recolectó con vagina artificial IMV Technologies a 40–45 °C y se transportó protegido de la luz directa y los cambios térmicos (10).

Se evaluaron volumen, color, motilidad masal, motilidad individual y concentración. Se aceptaron eyaculados sin contaminación visible, con motilidad individual  $\geq 70$  %, motilidad masal  $\geq 3/5$  y concentración  $\geq 2 \times 10^9$  espermatozoides/ml. La motilidad masal se observó a 10 $\times$  y la concentración mediante fotómetro SDM1 (Minitube), configurado para ovinos (11).

El complejo colesterol–metil- $\beta$ -ciclodextrina (CLC) se preparó mezclando 0,45 ml de una solución de colesterol en cloroformo, a 200 mg/ml, con 1 g de metil- $\beta$ -ciclodextrina disuelta en 2 ml de metanol, equivalentes a 90 mg de colesterol por gramo de ciclodextrina. Los solventes se evaporaron con nitrógeno; el material se secó durante 24 horas y almacenó a 22 °C. Se dispersaron 50 mg de CLC en 1 ml de TALP a 37 °C mediante vórtex (12).

T0 contenía Triladyl, yema y agua ultrapura, sin CLC. T1, T2 y T3 utilizaron 1 ml de Triladyl y 3 ml de agua ultrapura, sin yema, incorporando respectivamente 1, 2 y 3 mg de CLC por  $50 \times 10^6$  espermatozoides, equivalentes a 20, 40 y 60  $\mu$ l de solución. Tras equilibrar los componentes a 37 °C e incubar durante 15–20 minutos, se envasaron pajuelas de 0,25 ml con  $50 \times 10^6$  espermatozoides (13).

La congelación se realizó con el equipo CL5500 Freezcontrol (Minitube), con un descenso de 20 a –50 °C en aproximadamente 90 minutos, seguido de una caída rápida hasta aproximadamente –143 °C y almacenamiento a –196 °C en nitrógeno líquido. A las 24 horas se descongelaron las pajuelas a 37 °C durante 40 segundos con MT 30/54 (Minitube), manteniéndolas sobre una platina térmica Biotherm (14).

Se utilizó el sistema CASA Microptic SCA Evolution, con software SCA VET 6.6.64. Se analizaron 5  $\mu$ l de semen mediante un objetivo de contraste de fases de 10 $\times$ , manteniendo la temperatura a 37 °C. Se capturaron 50 imágenes por segundo durante un segundo por campo, examinando cinco campos y al menos 100 espermatozoides. Se registraron PR, NP, IM, VCL, VAP, VSL, LIN, STR, ALH y BCF, con umbrales VSL  $\geq 45$   $\mu$ m/s para progresivos y VCL  $< 5$   $\mu$ m/s para inmóviles.

La viabilidad se evaluó con eosina–nigrosina. Para HOST, se mezclaron 20  $\mu$ l de semen con 100  $\mu$ l de solución hiposmótica, incubando 45 minutos a 37 °C; se consideraron positivas las células con cola enrollada o curvada. Para MitoTracker Green (Invitrogen), se mezclaron 20  $\mu$ l de semen con 80  $\mu$ l de solución, incubando 15 minutos a 37 °C en oscuridad. La lectura de fluorescencia se realizó dentro de los 10 minutos siguientes a la incubación. Ambas pruebas incluyeron 100

espermatozoides a 400×; mediante MitoTracker se registraron los porcentajes con y sin fluorescencia verde en la pieza intermedia (15).

El ANOVA incorporó tratamiento y colecta. Se evaluaron normalidad de residuos mediante Shapiro–Wilk y homogeneidad de varianzas mediante Levene. Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias se compararon mediante Tukey, con significancia de 0,05. Los resultados se expresaron como medias y desviaciones estándar.

## RESULTADOS

En contraste de la calidad seminal post-descongelación, la misma presentó respuestas que difieren según el parámetro evaluado. Tomando en consideración que se observaron diferencias entre tratamientos en HOST, al igual que la eosina–nigrosina, marcación mitocondrial, linealidad y rectitud, mientras que las categorías de motilidad no mostraron diferencias significativas. En lo que respecta a los resultados, estos corresponden a cinco colectas del mismo reproductor, tomando en consideración que se realizaron cinco observaciones por tratamiento, y se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las dosis de 1, 2 y 3 mg de CLC corresponden a cada  $50 \times 10^6$  espermatozoides.

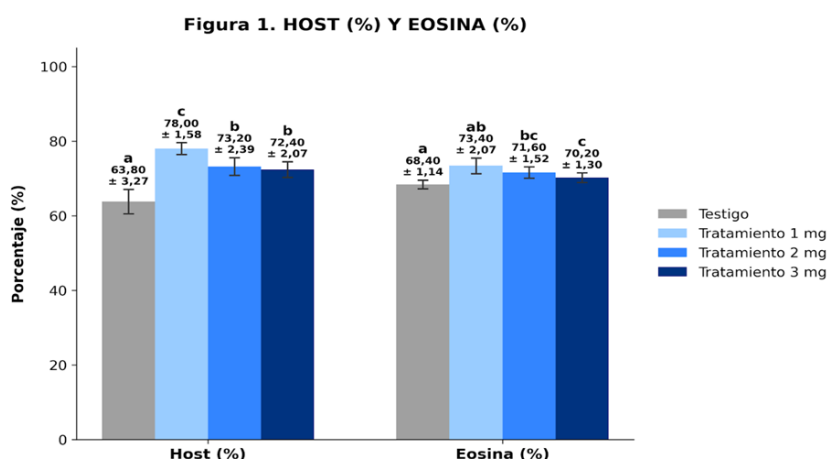


**Figura 2. Funcionalidad de la membrana plasmática y viabilidad espermática posdescongelación. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.**

En cuanto a la funcionalidad de la membrana plasmática en términos de HOST hubo variaciones entre diferentes tratamientos ( $p=0.001$ ). La dosis de 1 mg fue la que obtuvo el mayor porcentaje de respuesta positiva, el cual fue del  $78.00 \pm 1.58\%$ , en comparación con el grupo control que tuvo un  $63.80 \pm 3.27\%$ . La variación entre ambos fue de 14.20 puntos porcentuales. Considerando que las dosis de tratamiento de 2 y 3 mg dieron un  $73.20 \pm 2.39\%$  y  $72.40 \pm 2.07\%$  respectivamente estas fueron valores intermedios en comparación con el grupo control y la dosis de tratamiento

de 1 mg. De la distribución de Tukey la dosis de tratamiento de 1 mg difiere significativamente del resto de los tres grupos ya que las dosis de tratamiento de 2 y 3 mg comparten la misma letra.

La viabilidad evaluada mediante eosina-nigrosina también presentó diferencias globales ( $p = 0,001$ ). El mayor valor numérico correspondió a 1 mg, con  $73,40 \pm 2,07 \%$ , seguido de 2 mg, con  $71,60 \pm 1,52 \%$ , y 3 mg, con  $70,20 \pm 1,30 \%$ . El testigo registró  $68,40 \pm 1,14 \%$ . Las diferencias numéricas respecto al testigo fueron de 5,00, 3,20 y 1,80 puntos porcentuales, respectivamente. Así, las medias de viabilidad siguieron el mismo orden que HOST, aunque con una separación menor entre los cuatro tratamientos.

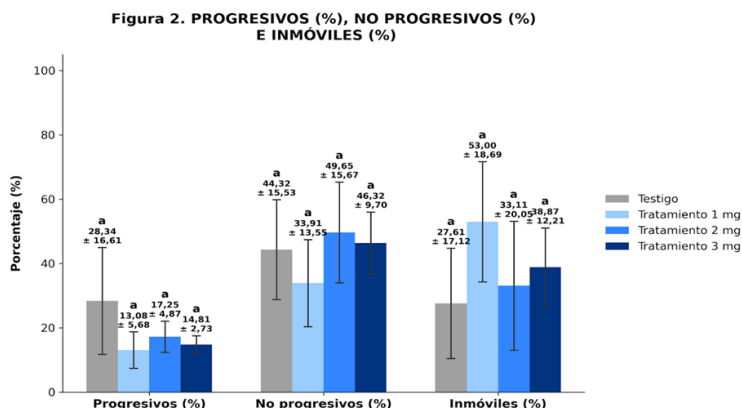


Figura 3. Porcentajes de espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

En cuanto respecta al porcentaje de espermatozoides progresivos no se detectaron diferencias significativas ( $p = 0,075$ ). Tomando en consideración que el testigo mostró la media más alta, con  $28,34 \pm 16,61 \%$ , en comparación con 1, 2 y 3 mg alcanzaron  $13,08 \pm 5,68 \%$ ,  $17,25 \pm 4,87 \%$  y  $14,81 \pm 2,73 \%$ , respectivamente. El grupo control mostró el porcentaje promedio más alto de  $28,34 \pm 16,61\%$ , mientras que los grupos de 1, 2 y 3 mg mostraron porcentajes de  $13,08 \pm 5,68\%$ ,  $17,25 \pm 4,87\%$  y  $14,81 \pm 2,73\%$  respectivamente. En cuanto a la motilidad no progresiva el grupo de 2 mg mostró el porcentaje más alto de  $49,65 \pm 15,67\%$ , seguido por el grupo de 3 mg con un  $46,32 \pm 9,70\%$  y el grupo control con un  $44,32 \pm 15,53\%$ . Por el contrario, el grupo de 1 mg tuvo un porcentaje de  $33,91 \pm 13,55\%$ . No hubo diferencias significativas en la comparación global ( $p=0,331$ ), por lo que el orden de estas medias se corresponde a una descripción de los valores observados.

La proporción de espermatozoides inmóviles fue de  $27,61 \pm 17,12 \%$  en el testigo,  $53,00 \pm 18,69 \%$  con 1 mg,  $33,11 \pm 20,05 \%$  con 2 mg y  $38,87 \pm 12,21 \%$  con 3 mg. Pese a la mayor media registrada con 1 mg, las diferencias no alcanzaron significancia estadística ( $p = 0,155$ ). Las desviaciones estándar reflejaron una dispersión considerable, especialmente en esta categoría. En las tres variables de motilidad, todos los tratamientos compartieron la letra «a». Estos resultados no demostraron una mejora de la motilidad asociada a las formulaciones con CLC, ni permiten afirmar equivalencia entre ellas.

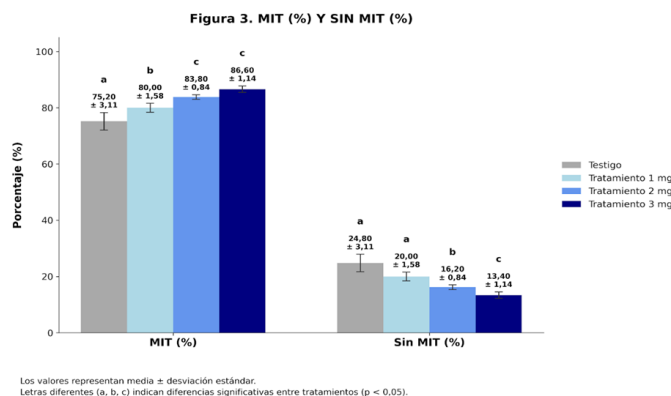


**Figura 4. Espermatozoides con marcación mitocondrial detectable y sin marcación detectable. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.**

El porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde detectable en la pieza intermedia, registrado como MIT, presentó diferencias globales entre tratamientos ( $p = 0.001$ ). El testigo alcanzó  $75,20 \pm 3,11$  %, mientras que las dosis de 1, 2 y 3 mg registraron  $80,00 \pm 1,58$  %,  $83,80 \pm 0,84$  % y  $86,60 \pm 1,14$  %, respectivamente. Las medias aumentaron de manera ordenada con las dosis evaluadas. El mayor porcentaje de células con marcación positiva se observó en el tratamiento de 3 mg.

En comparación con el testigo, las diferencias numéricas fueron de 4,80 puntos porcentuales para 1 mg, 8,60 para 2 mg y 11,40 para 3 mg. Entre las dosis consecutivas, el incremento de la media fue de 3,80 puntos porcentuales al pasar de 1 a 2 mg y de 2,80 al pasar de 2 a 3 mg. Estas diferencias describen la magnitud observada en la figura 3, sin establecer por sí mismas la significancia de cada comparación entre pares.

La categoría Sin MIT presentó el comportamiento inverso. El testigo registró  $24,80 \pm 3,11$  % de células sin fluorescencia detectable, frente a  $20,00 \pm 1,58$  %,  $16,20 \pm 0,84$  % y  $13,40 \pm 1,14$  % con 1, 2 y 3 mg, respectivamente. También se reportó una diferencia global para esta variable ( $p = 0.001$ ). En cada tratamiento, MIT y Sin MIT sumaron el 100 %, por lo que representan categorías complementarias de la misma evaluación. Los resultados expresan la proporción de células clasificadas según su marcación con MitoTracker Green; no constituyen mediciones directas de producción de ATP ni de capacidad fecundante.

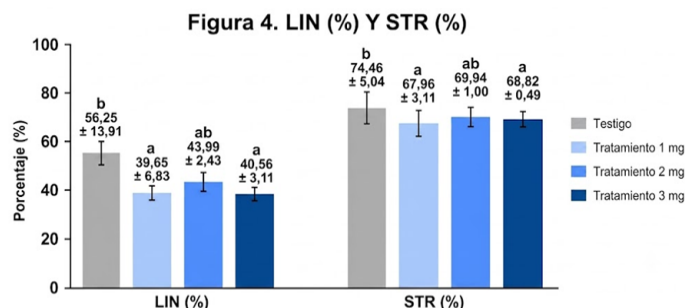


**Figura 5. Índices de linealidad y rectitud de la trayectoria espermática. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.**

El índice de linealidad (LIN) presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p = 0,017$ ). El testigo obtuvo la mayor media, con  $56,25 \pm 13,91$  %, seguido del tratamiento de 2 mg, con  $43,99 \pm 2,43$  %. Las dosis de 1 y 3 mg registraron  $39,65 \pm 6,83$  % y  $40,56 \pm 3,11$  %, respectivamente. Frente al testigo, las reducciones numéricas fueron de 16,60 puntos porcentuales con 1 mg, 12,26 con 2 mg y 15,69 con 3 mg.

La agrupación de Tukey indicó que el testigo, identificado con la letra «b», difirió de los tratamientos de 1 y 3 mg, identificados con «a». La dosis de 2 mg compartió ambas letras y no presentó diferencias significativas respecto a ninguno de esos grupos. De este modo, su media ocupó una posición intermedia, sin que ello permita atribuirle una superioridad estadística frente a las otras dosis de CLC.

El índice de rectitud (STR) mostró un patrón semejante, con diferencias globales ( $p = 0,016$ ). El testigo alcanzó  $74,46 \pm 5,04$  %, mientras que los tratamientos de 1, 2 y 3 mg registraron  $67,96 \pm 3,11$  %,  $69,94 \pm 1,00$  % y  $68,82 \pm 0,49$  %, respectivamente. La comparación de Tukey volvió a diferenciar al testigo de las dosis de 1 y 3 mg; el tratamiento de 2 mg compartió grupo con los restantes. En ambos índices, las mayores medias correspondieron al testigo. Dentro de los grupos con CLC, 2 mg presentó los valores numéricos más altos, aunque sin diferencias significativas frente a 1 y 3 mg.

## DISCUSIÓN

El análisis de los resultados muestra que las reacciones al colesterol-metil- $\beta$ -ciclodextrina (CLC) varían dependiendo de los parámetros utilizados para describir las respuestas. La dosis de 1 mg presenta el porcentaje máximo de reacción y el máximo valor medio de viabilidad, mientras que la dosis de 3 mg muestra el porcentaje más alto de células con tinción mitocondrial visible. Sin embargo, estos parámetros no están acompañados de una mejora significativa en la motilidad. Estas contradicciones nos impiden considerar la calidad seminal como una respuesta consistente al aumento de la dosis.

La reacción del HOST está de acuerdo con una mayor protección de la funcionalidad de la membrana plasmática. La diferencia de 14,20 puntos porcentuales entre la dosis de 1 mg y el grupo control corresponde en términos generales a la protección de la membrana reportada por

Batissaco et al (6). Como precedente para este experimento Mocé et al . observan que el tratamiento con CLC conduce a un aumento del colesterol en los espermatozoides de oveja (14).

La evaluación con eosina-nigrosina complementa esta observación, al mostrar su mayor media de viabilidad con 1 mg. No obstante, HOST y viabilidad no representan mediciones equivalentes: la primera prueba registra la respuesta al medio hipotónico y la segunda clasifica las células según la entrada del colorante. Su coincidencia descriptiva favorece una lectura conjunta de la conservación celular, pero no demuestra que todos los tratamientos con CLC superen estadísticamente al testigo en viabilidad.

Contrarrestando el hecho de que no existen diferencias notables entre los espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles se hacen evidentes los avances en cuanto a la motilidad en algunos otros protocolos que utilizan el CLC. Batissaco et al. destacan los efectos positivos particularmente en las muestras de baja y media crio preservación mientras que las reacciones son diferentes en las muestras de alta crio preservación (6). Esto resulta útil para explicar la ausencia de cualquier reacción a pesar de que las ovejas que se están examinando no pertenecen a estas categorías ya que no se puede afirmar a partir de los datos disponibles.

En lo que refiere a la marcación mitocondrial muestra un patrón diferente: la proporción de células MIT aumenta desde 75,20 % en el testigo hasta 86,60 % con 3 mg. Este hallazgo indica una mayor frecuencia de fluorescencia detectable en la pieza intermedia bajo el procedimiento empleado. Por su parte, en lo que refiere a su alcance debe mantenerse en ese nivel, porque la clasificación positiva o negativa no cuantifica directamente producción de ATP, potencial de membrana ni eficiencia energética.

Por su parte, la cinética de los espermatozoides la cual representa el mejor medio de LIN y STR está relacionada con el control y difiere de 1 y 3 mg. Esto indica que los resultados más positivos en la prueba de las membranas no garantizan un nivel más alto de linealidad o de dirección. La falta de diferencia en VCL, VAP, VSL, ALH y BCF no ofrece la oportunidad de afirmar una mejora general del movimiento. En particular una diferencia en la linealidad no indica ningún cambio en la capacidad de fertilización.

En Ecuador, Mancheno Herrera et al. una mejor conservación estructural para las dosis de 0.5 y 1 mg en el semen de carneros Pelibuey y Blackbelly (7). Por su parte, el vínculo entre los resultados positivos a dosis bajas es interesante pero la composición racial diferente y el método de dosificación influyen directamente en la comparabilidad entre estas investigaciones.

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales, la dosis de 1 mg de CLC por cada  $50 \times 10^6$  espermatozoides da el mejor desempeño en la prueba HOST, con un 78,00 % frente al 63,80 % en el control. La mayor viabilidad media se registra con 1 mg, según la evaluación con eosina-nigrosina, y esto data que sea estadísticamente mejor que todos los otros tratamientos. Aquellos resultados permiten seguir investigando la dosis por su buena respuesta en la preservación de la membrana espermática. Sin embargo, esta dosis aún no puede considerarse la más adecuada para la calidad

total del semen. Por otra parte, la dosis de 3 mg tiene el mayor porcentaje de células con marcación mitocondrial detectable, del 86,60 %. Esto no demuestra una producción de ATP aumentada ni una mejor capacidad de fertilización. En lo que se refiere a la motilidad, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las categorías de motilidad ni en los parámetros VCL, VAP, VSL, ALH y BCF. Al contrario, el grupo control tiene valores significativamente más altos de LIN y STR que los tratamientos de 1 y 3 mg. Por lo tanto, el efecto del CLC depende del parámetro que se esté analizando.

Finalmente, en el análisis de cinco colectas de un carnero Katahdin, los resultados nos brindan una aproximación inicial, la cual debe ser validada por estudios posteriores en otros reproductores. Además, la disparidad entre las formulaciones nos impide atribuir las diferencias frente al tratamiento de control exclusivamente al CLC y no permite concluir que este sustituya la yema de huevo de manera igual de eficaz. Para avanzar en el estudio del CLC será necesario contar con más animales, realizar estudios comparativos que nos ayuden a diferenciar los efectos de ambos componentes y realizar pruebas de fertilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Padilla L, Muiño R, Encinas T, et al. Suplementación con complejos colesterol-ciclodextrina en el diluyente de congelación de semen ovino. *Arch Zootec.* 2016;65(251):303-10. doi: 10.21071/az.v65i251.691
2. Vizuete MF, Soria MA, Valenzuela JC. Caracterización socioproductiva y evaluación de la calidad seminal de ovinos en comunidades altoandinas del Ecuador. *Rev Investig Vet Perú.* 2022;33(4):e23341. doi: 10.15381/rivp.v33i4.23341
3. Ledesma A, Fernandez-Alegre E, Cano A, Hozbor F, Martinez-Pastor F. Ram sperm microarchitecture is affected by cryopreservation, showing loss of specific lipids and proteins. *Cryobiology.* 2019;89:42-51. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.06.002
4. Hernández Ballesteros JA, Benítez Meza JA, Navarrete Méndez R, Gómez Gurrola A, Loya Olgún JL. Efecto de colesterol ligado a ciclodextrinas y antioxidantes en la crioprotección espermática del bovino. *Revista Veritas de Difusão Científica.* 2025;5(3):1817-47. doi: 10.61616/rvdc.v5i3.317.
5. Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Gadella BM. Membrane lipid composition and its influence on ram sperm cryotolerance. *Reprod Domest Anim.* 2020;55(1):34-42. doi: 10.1111/rda.13580
6. Batissaco L, Arruda RP, Alves MBR, Torres MA, Lemes KM, Prado-Filho RR, et al. Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability. *Reprod Biol.* 2020;20(1):14-24. doi: 10.1016/j.repbio.2020.01.002.
7. Gloria A, Carluccio A, Contri A, Wegher L, Valorz C, Robbe D. The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Andrology.* 2013;1(6):879-885. Mancheno Herrera CA, Llerena Zambrano JC, Herrera Ocaña HR, Condolo Ortiz LA, Mullo Paucar SP. Efecto del complejo ciclodextrina-colesterol sobre la calidad seminal pre y post criopreservación en ovino Pelibuey y Blackbelly. *Revista Científica Multidisciplinaria InvestiGo.* 2026;7(18):84-98. doi: 10.56519/2hs4gy44. doi: 10.1111/j2047-2927.2013.00121

8. Labanda Sigcho JE, Moscoso Piedra AL, Alvarado JC, Maldonado Cornejo ME. Efecto de hembras estrogenizadas sobre el comportamiento sexual y la calidad seminal del carnero. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2025;9(1):8411-25. doi: 10.37811/cl\_rcm.v9i1.16484.
9. Valdez-Pinargote G, Moscoso-Piedra A, Maldonado-Cornejo M. Efecto de la concentración de la L-carnitina en congelación del semen ovino. *MQRInvestigar*. 2024;8(4):7324-41. doi: 10.56048/MQR20225.8.4.2024.7324-7341.
10. Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 2004;48(1):36-45. doi: 10.1016/j.cryobiol.2003.12.001.
11. Lema Guamán MF, Maldonado Cornejo ME, Alvarado JC, Moscoso Piedra AL. Evaluación del efecto combinado de la menaquinona-4 y L-carnitina sobre la crioconservación de semen ovino. *ASCE*. 2025;4(3):1906-26. doi: 10.70577/ASCE/1906.1926/2025.
12. Farfán-Alvarado KD, Alvarado-Alvarado JC, Moscoso-Piedra AL. Determinación del efecto post congelación de microdosis de menaquinona-4 en semen ovino. *MQRInvestigar*. 2025;9(3):e903. doi: 10.56048/MQR20225.9.3.2025.e903.
13. Guamarriga Sanchez IC, Alvarado JC, Moscoso Piedra AL, Maldonado Cornejo ME. Evaluación del efecto combinado de coenzima Q10 y L-carnitina sobre la crioconservación de semen ovino. *ASCE*. 2025;4(3):1793-1811. doi: 10.70577/ASCE/1793.1811/2025.
14. Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci*. 2010;118(2-4):236-47. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.06.013.
15. Salmon WJ, Ceballos-Posadas HE, Vázquez-García MO, Rodríguez-Almeida FA, Córdova-Izquierdo A, Villa-Mancera A. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-based extender. *Theriogenology*. 2017;89:127-134. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.025
16. Akçay E, Reçber T, Yeste M, Duman M. Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Reprod Domest Anim*. 2018;53(6):1481-1489. doi: 10.1111/rda.13328
17. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Delgado-Bermúdez A, Álvarez M, de Paz P, Garde JJ, et al. Addition of cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing improves the quality of ram spermatozoa post-thawing. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(8):1227-1237. doi: 10.1071/RD14041
18. Arando A, Delgado JV, Fernández-Prior Á, León JM, Pérez-Marín CC. Effect of quercetin supplementation in the freezing extender on ram sperm quality and lipid peroxidation after thawing. *Anim Reprod Sci*. 2019;208:106118. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.07.005
19. Silva ECB, Silva SV, Souza HM, Santos CB, Guerra MMP. Addition of alpha-tocopherol to cholesterol-loaded cyclodextrin-treated ram sperm: Effects on post-thaw quality and oxidative stress parameters. *Cryobiology*. 2014;69(1):123-128. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.06.004
20. Fang Y, Zhai Y, Zhang L, Zhao X, Li F. Effects of melatonin supplementation in the freezing extender on post-thaw quality, oxidative stress, and apoptosis of ram sperm. *Theriogenology*. 2020;154:174-181. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.05.034