

SSTSDS-Vol.4. N1. 089

Evaluación del efecto de la postcongelación de la cafeína en semen ovino inmaduro

Evaluation of the effect of post thaw caffeine treatment on immature ovine semen

Autores:

Jeandry Alexander Aguilar Tacuri
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca – Ecuador

jeandry.aguilar.13@est.ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0004-6093-0397>

Manuel Maldonado Cornejo
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca – Ecuador

mmaldonadoc@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-1507-2280>

Juan Carlos Alvarado Alvarado
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca – Ecuador

jalvaradoa@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-7240-179X>

Andres Leonardo Moscoso Piedra
Universidad Católica de Cuenca
Cuenca – Ecuador

amoscosop@ucacue.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-4017-0165>

Autor de correspondencia: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri,
jeandry.aguilar.13@est.ucacue.edu.ec

Recepción: 09-mayo-2026

Aceptación: 09-junio-2026

Publicación: 22-julio-2026

Cómo citar este artículo:

Aguilar Tacuri, J. A., Maldonado Cornejo, M., Alvarado Alvarado, J. C., & Moscoso Piedra, A. L. (2026). Evaluación del efecto de la postcongelación de la cafeína en semen ovino inmaduro. *Sage Sphere of Technology, Sciences, Discoveries And Society*, 4(1), 1-19. <https://doi.org/10.63688/vqawfa06>

© 2026; Los autores. Este es un artículo en acceso abierto, distribuido bajo los términos de una licencia Creative Commons (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea correctamente citada.



RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cafeína (0 μM , 0.125 μM , 2 μM y 8 μM) sobre la calidad seminal postcongelación de un ovino de la raza Dorper, considerando distintos tipos de colecta seminal (primer salto, tercer salto, intervalos mayores a 48 horas e intervalos menores a 48 horas), con el fin de determinar la influencia de esta molécula sobre los parámetros seminales en diferentes momentos de colecta y establecer su posible efecto biológico sobre la funcionalidad espermática en animales reproductivamente activos. La cafeína es un modulador energético que actúa al instante en las células, por lo que se especuló que podría reactivar la motilidad y la actividad mitocondrial evaluada a través de la progresividad y cinemática en el sistema (CASA), la permeabilidad de membrana, vitalidad utilizando test Host y Eosina-Nigrosina respectivamente, además de evaluar la actividad mitocondrial con el uso de Mitotracker Green. Los resultados indicaron que no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamiento en la mayoría de variables analizadas ($p > 0.05$), no obstante, en la progresividad espermática se observó un comportamiento superior en la tercera colecta recurrente con la dosis de 2 μM de cafeína, evidenciado un efecto diferencial bajo condiciones de mayor desgaste fisiológico del espermatozoide. Se concluye que la cafeína no favoreció ni afectó, la calidad seminal postcongelación, sin embargo, bajo determinadas condiciones asociadas al desgaste espermático como colectas seguidas, la molécula favorece la motilidad progresiva del semen, evidenciando un efecto fisiológico de la molécula en el semen ovino inmaduro.

Palabras clave: CASA; Mitotracker Green; cinemática; actividad mitocondrial; motilidad progresiva.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of caffeine (0 μM , 0.125 μM , 2 μM , and 8 μM) on post-freezing semen quality in Dorper sheep, considering different types of semen collection (first mount, third mount, intervals longer than 48 hours, and intervals shorter than 48 hours), in order to determine the influence of this molecule on semen parameters at different collection times and to establish its possible biological effect on sperm function in reproductively active animals. Caffeine is an energy modulator that acts instantly on cells; therefore, it was hypothesized that it could reactivate motility and mitochondrial activity assessed through progression and kinematics in the CASA system as well as membrane permeability and vitality, using the Host test and Eosin-Nigrosin test, respectively, in addition to evaluating mitochondrial activity using Mitotracker Green. The results indicated that there were no statistically significant differences between treatment groups for most of the variables analyzed ($p > 0.05$); however, in terms of sperm progressive motility, superior performance was observed in the third repeated collection with the 2 μM caffeine dose, demonstrating a differential effect under conditions of greater physiological sperm exhaustion. It is concluded that caffeine neither improved nor impaired post-freezing semen quality; however, under certain conditions associated with sperm exhaustion—such as consecutive collection the molecule promotes progressive motility in semen, demonstrating a physiological effect of the molecule on immature ovine semen.

Keywords: CASA; Mitotracker Green; kinematics; mitochondrial activity; progressive motility.



1. INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de las biotecnologías reproductivas ha permitido avances significativos en la producción animal. La criopreservación del semen es una herramienta clave para conservar la fertilidad de los machos reproductores y facilitar programas de inseminación artificial a gran escala. En los ovinos el uso de semen congelado representa una ventaja estratégica para la mejora genética aumentando la eficiencia reproductiva que sigue siendo limitada por la calidad espermática luego del proceso de descongelación (Spanner et al., 2024).

Durante la congelación y descongelación los espermatozoides sufren alteraciones estructurales y funcionales que comprometen su capacidad fertilizante. Las principales afectaciones incluyen daño mitocondrial, pérdida de integridad de membrana y disminución de la motilidad, procesos relacionados con el estrés oxidativo generado por la producción excesiva. Estos efectos se intensifican en semen proveniente de carneros jóvenes o inmaduros, cuyos espermatozoides presentan mayor sensibilidad a condiciones extremas del proceso criogénico. (Kaltsas, 2023).

Varios estudios han explorado el uso de antioxidantes exógenos común alternativa para mitigar el daño oxidativo en espermatozoides preservados. Entre estas sustancias, la cafeína ha demostrado efectos beneficiosos en la activación espermática. Al estimular la motilidad, preservar la función mitocondrial y mejorar la respuesta antioxidante celular. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la fosfodiesterasa (Nikitaras et al., 2022; Castro et al., 2016).

Pese a sus propiedades, la aplicación de la cafeína en semen ovino inmaduro crío preservado ha sido escasamente estudiada, abriendo la necesidad de evaluar su efecto en distintos parámetros espermáticos postcongelación. Esta investigación busca contribuir al desarrollo de estrategias que mejoren la fertilidad en ovinos jóvenes mediante el uso de compuestos bioactivos como la cafeína durante la criopreservación.

Criopreservación de la muestra seminal

La criopreservación del semen en ovinos es una herramienta valiosa para programas de mejora genética y reproducción asistida. Sin embargo, su efectividad se ve limitada por los daños estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el proceso de



congelación y posterior descongelación. Este efecto es aún más crítico cuando se utiliza semen proveniente de carneros inmaduros, ya que sus células espermáticas poseen una menor resistencia a las agresiones del proceso criogénico (Khosravizadeh et al., 2022).

Uno de los principales factores responsables del deterioro de la calidad espermática es el estrés oxidativo causado por la sobreproducción de especie reactivas de oxígeno. Estas moléculas dañan componentes celulares clave como las membranas plasmáticas, las mitocondrias y el (ADN), lo cual conduce a una disminución significativa en la motilidad, viabilidad e integridad estructural del esperma (Kaltsas, 2023).

Daño oxidativo y función del alcaloide

Frente a este desafío, el uso de antioxidantes ha sido propuesto como una estrategia para contrarrestar el daño oxidativo en semen crío preservado. La cafeína es un alcaloide natural presente en varias especies vegetales, se ha estudiado por su capacidad para mejorar la motilidad espermática y proteger la funcionalidad mitocondrial. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la fosfodiesterasa, lo que incrementa los niveles intracelulares de (AMPC) favoreciendo la activación celular. Además, ha demostrado propiedades antioxidantes que podrían contribuir a la protección de las células espermáticas durante el proceso de congelación (Castro et al., 2016; Nikitaras et al., 2022).

En el área de reproducción animal ciertos compuestos bioactivos referentes a la crioconservación del semen han sido una estrategia ampliamente investigada para reducir el estrés oxidativo y mejorar la funcionalidad espermática entre estos compuestos, la cafeína ha demostrado efectos positivos sobre la movilidad y vitalidad espermática en distintas especies. Castro et al. (2016) demostraron que la cafeína al ser adicionada a semen bovino incrementó la motilidad progresiva y disminuyó los niveles de peroxidación lipídica, lo que sugiere un papel protector durante la criopreservación.

Influencia de la cafeína sobre el funcionamiento espermático

La cafeína es un alcaloide de origen vegetal ampliamente distribuido en plantas como el café, té y cacao. Actúa como inhibidor competitivo de la enzima fosfodiesterasa, lo que produce un aumento en los niveles intracelulares de (AMPC), una molécula clave en la regulación de la motilidad espermática. Además, se ha demostrado que la cafeína tiene prioridades antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres e incluso mejorar la función mitocondrial (Obayashi y Sato, 2020).



Así mismo, Nikitaras et al. (2022) recopilaron evidencias sobre los mecanismos de acción de la cafeína, destacando su capacidad para inhibir la fosfodiesterasa y aumentar los niveles de AMPc, lo que estimula el mecanismo espermático y la función mitocondrial. Esta acción también podría contribuir a una mayor resistencia de los espermatozoides frente a los daños por congelación.

2. METODOLOGÍA

Este estudio de tipo experimental se desarrolló en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, ubicado en la provincia del Azuay, cantón Cuenca en el kilómetro 2 ½ de la Panamericana Norte.

Diseño experimental

Para el desarrollo del estudio se empleó un carnero de raza Dorper, clínicamente sano y de fertilidad comprobada, del que se obtuvieron muestras seminales a partir de 10 colectas, distribuidas en 5 colectas del primer salto y 5 del tercer salto. De estas, 6 colectas se realizaron en un intervalo >48 horas (Normal) y 4 en un intervalo <48 horas entre colectas (Recurrente). El estudio se desarrolló bajo un diseño de bloques completamente al azar conformado por un bloque cruzando la colecta x tiempo entre colectas; mientras los cuatro tratamientos fueron conformados por un tratamiento control (T0) sin adición de cafeína (0 μ M) y tres tratamientos con : 0.125 μ M (T1), 2 μ M (T2) y 8 μ M (T3) del aditivo, de los que se realizaron cuatro repeticiones obteniendo un total de 16 pajillas por colecta y un total de 160 pajillas evaluadas.

Tabla 1

Concentraciones y tratamientos con cafeína

Tratamientos	Concentración de Cafeína
T0	0 μ M
T1	0.125 μ M
T2	2 μ M
T3	8 μ M

Nota. T0 corresponde al tratamiento testigo sin cafeína; T1, T2 y T3 corresponden a las concentraciones de 0,125 μ M, 2 μ M y 8 μ M de cafeína, respectivamente. Elaboración propia.

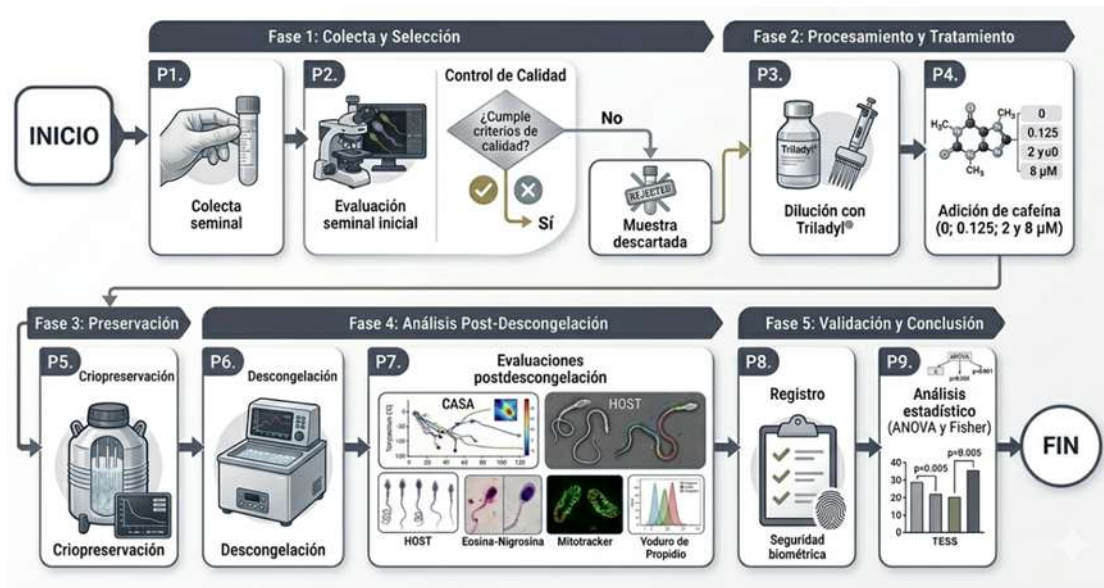
Se selecciono un carnero clínicamente sano de la raza productiva Dorper criado en condiciones controladas. La colecta seminal se llevó a cabo utilizando vagina



artificial (IMV technologies) dispositivo que permite una obtención fisiológicamente adecuada del eyaculado. Para asegurar la estimulación adecuada se utilizó una hembra como animal señuelo. La vagina artificial se utilizó con agua a una temperatura de 40–45 °C, y la muestra fue recogida en un tubo estéril manteniéndose a 37 °C en baño maría hasta su análisis. (Asanza-Domínguez et al., 2025).

Figura 1

Flujo metodológico de proceso experimental



Nota. La figura representa las etapas desarrolladas durante el experimento, desde la colecta y evaluación inicial del semen hasta la dilución, criopreservación, descongelación, aplicación de los tratamientos con cafeína y evaluación de los parámetros espermáticos. Elaboración propia.

Fase de laboratorio

En la fase de laboratorio, las muestras seminales fueron transportadas al laboratorio de reproducción animal y mantenidas a 37 °C para preservar su viabilidad. Posteriormente, se realizaron evaluaciones macroscópicas y microscópicas con el fin de determinar la calidad seminal antes del proceso de criopreservación en base a la Tabla 2.

Tabla 2

Evaluación seminal inicial

Evaluación	Descripción del procedimiento
------------	-------------------------------



Volumen seminal	Medición del eyaculado en μL mediante pipeta graduada estéril
Color y aspecto	Evaluación visual del semen, considerado color blanco cremoso y ausencia de alteraciones
pH seminal	Determinado mediante papel indicador universal o potenciómetro
Motilidad masal (MM)	Observación microscópica a 10X para evaluar movimiento colectivo espermático
Motilidad individual (MI)	Evaluación microscópica a 40x para determinar porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo
Concentración espermática	Determinada mediante fotómetro Minitube, expresada en millones de espermatozoides/mL

Nota. Se presentan los parámetros macroscópicos y microscópicos utilizados para determinar la calidad inicial de las muestras seminales antes de la dilución y criopreservación. MM = motilidad masal; MI = motilidad individual; μL = microlitros; mL = mililitros. Elaboración propia.

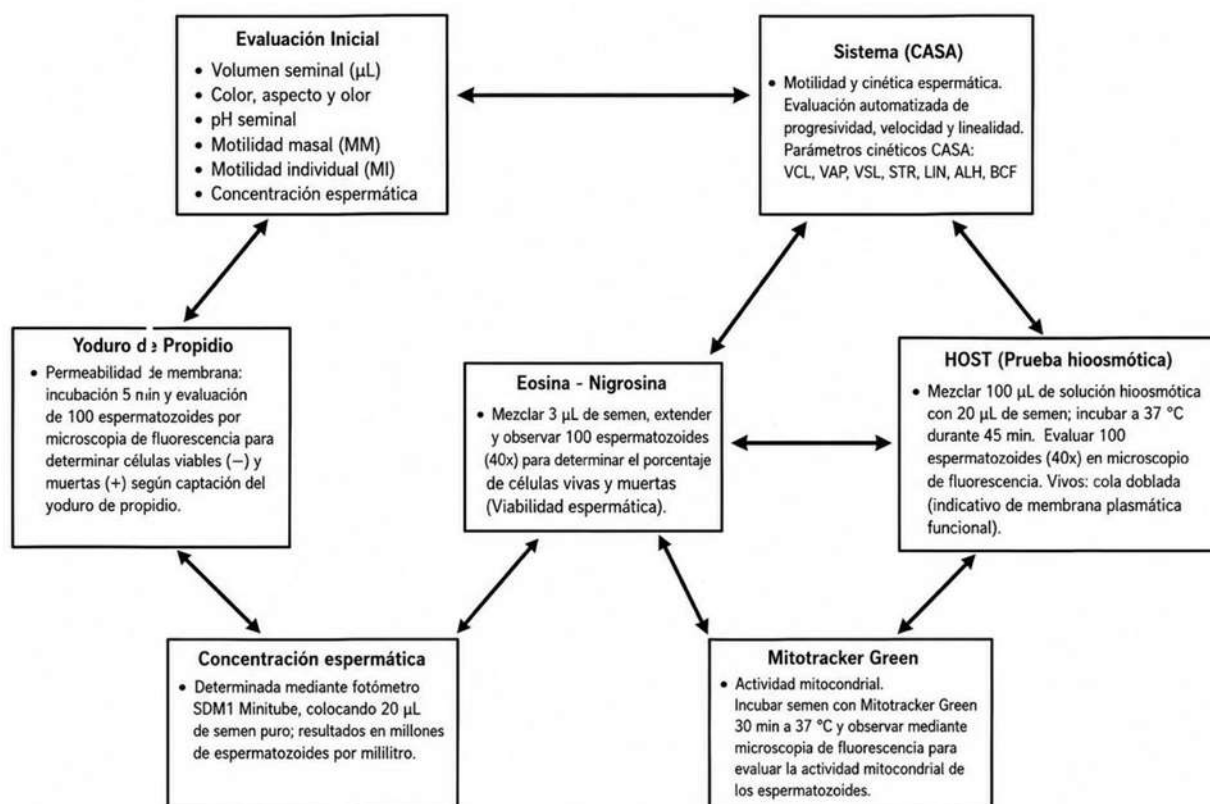
Las muestras que presentaron parámetros adecuados de calidad seminal fueron procesadas para la etapa de dilución y criopreservación. Inicialmente después de la colecta seminal se realizó la evaluación macroscópica del eyaculado, considerando color, olor y volumen. Posteriormente se tomaron 20 μL de semen para determinar la concentración espermática mediante el fotómetro SDM1 (Minitube). Posterior a esto se evaluaron las características microscópicas incluyendo la motilidad masal y la motilidad individual, con el fin de verificar que la muestra cumpliera los criterios mínimos de calidad. (Suqui et al., 2026). A continuación, se realizó una predilución (1:1) utilizando una solución madre previamente preparada y mantenida en baño maría a 37 °C. Esta solución estuvo compuesta por Triladyl® (Minitube) yema de huevo y agua ultrapura (Sigma Aldrich) en proporción 1:1:3. (Farfán-Alvarado et al., 2025). La predilución se efectuó adicionando un volumen igual de solución por cada volumen de semen recolectado; por ejemplo, por cada ml de semen se agregó un ml de la solución madre. Inmediatamente las muestras fueron sometidas al proceso de criopreservación para su posterior evaluación postcongelación.



A continuación, el semen fue distribuido en pajuelas destinadas a la criopreservación y sometido a un proceso controlado de congelación mediante el equipo Freeze Control Cryobath CL5500, con el programa (6). Aplicando un descenso gradual de temperatura desde 20 °C hasta -50 °C en un periodo de 90 minutos para luego pasar a caída libre alcanzando temperaturas de -142 °C. Finalmente, las pajuelas fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196 °C (Lema-Guamán et al., 2025) para garantizar la conservación de la viabilidad espermática a largo plazo. Luego las muestras crio preservadas fueron descongeladas y sometidas a diferentes pruebas para evaluar la funcionalidad espermática postcongelación.

Figura 2

Evaluación seminal inicial y postcongelación



Nota. La figura muestra los procedimientos empleados para evaluar la calidad seminal antes de la criopreservación y después de la descongelación, considerando viabilidad, integridad de membrana, actividad mitocondrial y características de motilidad espermática. Elaboración propia.

Finalmente, los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANOVA para cada tratamiento × combinación (número de colecta y tiempo entre colectas) y



posteriormente se aplicó la prueba de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$) para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos y tipos de colecta.

3. RESULTADOS

Una vez obtenidos los resultados, el análisis de varianza (ANOVA) de doble entrada permitió evaluar el efecto de los varios tratamientos con la cafeína y los diferentes tipos de colecta sobre los parámetros espermáticos. De manera general, los resultados indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), lo que sugiere que las concentraciones de cafeína utilizadas no produjeron cambios relevantes en la calidad seminal postcongelación, como se muestra en la Tabla 4.

De igual forma, al analizar la interacción entre tratamiento y tipo de colecta ($T \times C$), tampoco se evidenciaron diferencias ($p > 0.05$), lo que nos indica que el comportamiento de los tratamientos se mantiene similar independientemente del tipo de colecta.

Tabla 3

Tabla de Contingencia y Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros espermáticos evaluados.

Tratamiento	Colecta	Host %	Eosina %	Mitocondria %	Progresivo %	Inmóviles %	STR %	LIN %
TESTIGO	Normal Primera	82.0 ±	72.0 ±	6.00 ± 6.00	14.1 ± 0.918	73.3 ± 4.39	69.9	40.9
		9.17	14.0				±	±
							5.79	1.07
	Recurrent e Primera	77.0 ±	27.5 ±	2.50 ± 0.707	27.7 ± 16.1	63.2 ± 20.9	80.5	52.1
		12.7	19.1				±	±
							0.57	1.17
	Normal Tercera	20.0 ±	31.7 ±	44.7 ± 5.86	27.6 ± 13.5	40.7 ± 22.0	55.7	25.6
		11.3	8.50				±	±
							1.85	4.75
	Recurrent e Tercera	49.5 ±	53.5 ±	37.5 ± 0.707	26.4 ± 19.0	41.9 ± 31.0	57.7	30.8
		3.54	9.19				±	±
							1.93	1.44
MIN 1/8Um	Normal Primera	69.7 ±	82.3 ±	10.7 ± 11.6	21.7 ± 4.33	57.8 ± 2.86	67.2	39.2
		6.66	2.08				±	±
							3.85	3.33



MAX 8uM	Recurrente Primera	78.0 ± 2.83	26.5 ± 10.6	5.00 ± 2.83	23.7 ± 3.41	56.6 ± 8.22	72.5 ± 0.969	45.0 ± 1.67
	Normal Tercera	36.0 ± 10.6	31.0 ± 10.5	37.3 ± 4.04	29.2 ± 15.8	31.5 ± 27.5	57.8 ± 7.03	30.5 ± 7.10
	Recurrente Tercera	45.0 ± 0.00	47.5 ± 17.7	34.5 ± 6.36	32.8 ± 2.85	17.0 ± 11.3	63.2 ± 0.799	34.6 ± 0.940
	Normal Primera	78.3 ± 8.33	81.3 ± 7.37	15.3 ± 7.77	21.3 ± 12.1	67.1 ± 11.5	76.2 ± 8.37	51.1 ± 12.3
	Recurrente Primera	63.5 ± 2.12	20.0 ± 7.07	4.00 ± 1.41	23.7 ± 12.5	59.3 ± 10.6	70.5 ± 10.6	44.4 ± 10.4
	Normal Tercera	39.0 ± 11.8	39.7 ± 10.0	47.0 ± 13.0	27.3 ± 8.92	25.8 ± 22.5	59.8 ± 5.57	31.5 ± 7.15
	Recurrente Tercera	52.0 ± 1.41	43.0 ± 2.83	52.0 ± 14.1	27.7 ± 5.52	32.1 ± 9.53	58.9 ± 5.13	31.1 ± 7.49
	Normal Primera	79.3 ± 11.5	82.3 ± 6.03	4.00 ± 6.08	12.4 ± 10.8	75.7 ± 22.7	68.9 ± 1.39	38.2 ± 9.60
	Recurrente Primera	76.5 ± 9.19	23.0 ± 5.66	4.00 ± 5.66	22.0 ± 21.5	60.3 ± 36.7	72.3 ± 4.93	41.3 ± 8.73
	Normal Tercera	38.7 ± 8.39	32.7 ± 7.37	40.7 ± 6.43	25.1 ± 9.81	38.9 ± 19.7	60.9 ± 5.09	31.8 ± 5.64
	Recurrente Tercera	48.0 ± 5.66	43.0 ± 5.66	33.5 ± 6.36	49.1 ± 12.6	9.60 ± 5.30	71.3 ± 7.58	46.4 ± 8.23
	Normal Tercera	38.7 ± 8.39	32.7 ± 7.37	40.7 ± 6.43	25.1 ± 9.81	38.9 ± 19.7	60.9 ± 5.09	31.8 ± 5.64



						0.60	0.82
Valor p Tratamientos	0.802	0.988	0.067	0.919	0.465	9	1
						0.00	0.00
Valor p Colecta	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	1	1
						0.10	0.12
Valor p Tx C	0.132	0.723	0.699	0.687	0.918	7	3

Nota. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. HOST = prueba hipoosmótica para determinar la integridad funcional de la membrana espermática; Eosina = viabilidad espermática evaluada mediante eosina-nigrosina; Mitocondria = actividad o masa mitocondrial; Progresivo = espermatozoides con motilidad progresiva; STR = índice de rectitud; LIN = índice de linealidad; T $\times$ C = interacción entre tratamiento y tipo de colecta. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Elaboración propia.

Cabe recalcar que al analizar el factor colecta de manera independiente sí hubo diferencias altamente significativas ($p < 0.05$) en todas las variables evaluadas. Esto indica que el intervalo entre colecta influye de manera importante en la calidad espermática, observándose variaciones con mayor tiempo de descanso (48 horas consideradas normales) y aquellas de intervalos más cortos (24 horas, denominadas recurrentes). Las colectas normales con mayor tiempo de recuperación espermática mostraron comportamientos distintos frente a las colectas recurrentes. Esto resalta la importancia del manejo del tiempo de colecta como un factor determinante en la calidad del semen ovino inmaduro (Carvajal-Serna et al., 2018; Trejo Córdova., 2025).

Una vez determinadas las diferencias, estos resultados se reflejan en todas las variables analizadas (prueba de HOST, eosina-nigrosina, actividad mitocondrial, motilidad progresiva, porcentaje de inmóviles, así como los índices cinéticos STR y LIN)

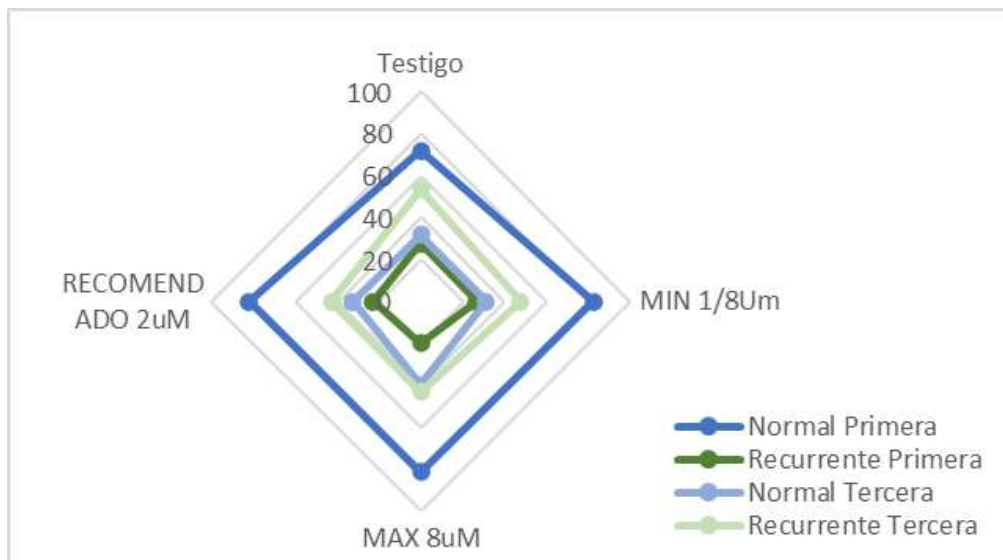
Se realizó un análisis ANOVA diferenciado por tipo de colecta de manera separada, considerando los resultados que indican diferencia entre colectas. Este enfoque permitió analizar de forma independiente el comportamiento de los tratamientos sin la influencia de la combinación de factores.

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos se aplicó la prueba post hoc de comparación de medias de Fisher en aquellos parámetros que resultaron significativos ($p < 0,05$).



Figura 3

Variación del porcentaje de viabilidad espermática (Eosina-Nigrosina) en función de los tratamientos y tipo de colecta.



Nota. La viabilidad espermática fue evaluada mediante la tinción de eosina-nigrosina. Se compararon el tratamiento testigo y las concentraciones de 0,125 μ M, 2 μ M y 8 μ M de cafeína en colectas normales y recurrentes del primer y tercer salto. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). Elaboración propia.

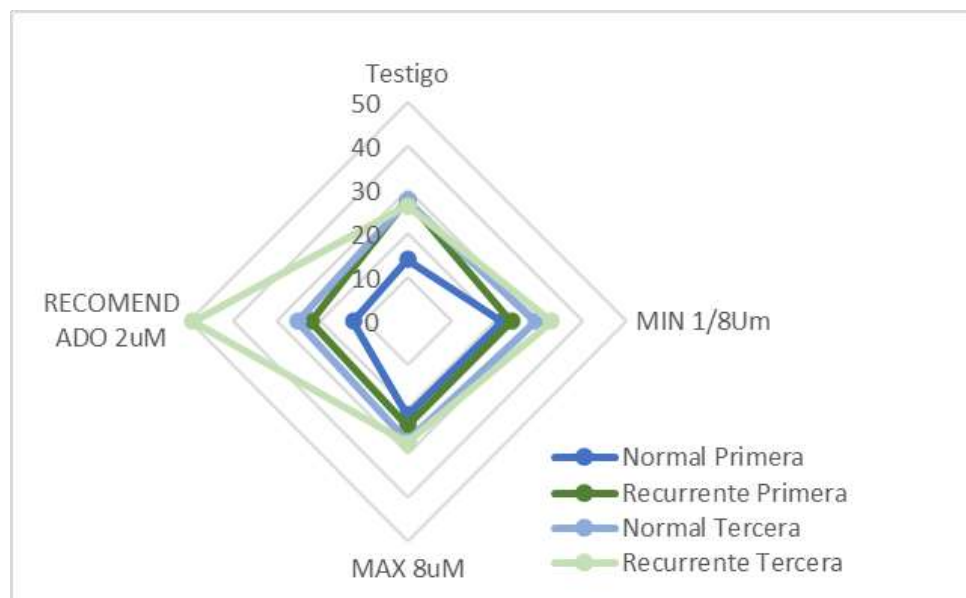
Los resultados de este análisis diferenciado se presentan en la Figura 3, donde se observan las variaciones en el porcentaje de viabilidad espermática evaluada mediante la variable Eosina-Nigrosina, sin evidenciar diferencias significativas ($p > 0,05$). A diferencia de lo observado en la variable de viabilidad, el análisis diferenciado aplicado a la progresividad espermática evidenció un comportamiento distinto entre los tratamientos ($p < 0,05$). Con base en la Figura 4, se puede observar el efecto de las diferentes concentraciones de cafeína en función del tipo de colecta.

En la colecta recurrente correspondiente a la tercera extracción, el tratamiento con 2 μ M de cafeína presentó valores superiores en comparación con los demás tratamientos, evidenciando un efecto positivo sobre la motilidad progresiva.



Figura 4

Comportamiento de la motilidad progresiva espermática en relación con las concentraciones de cafeína y tipo de colecta.



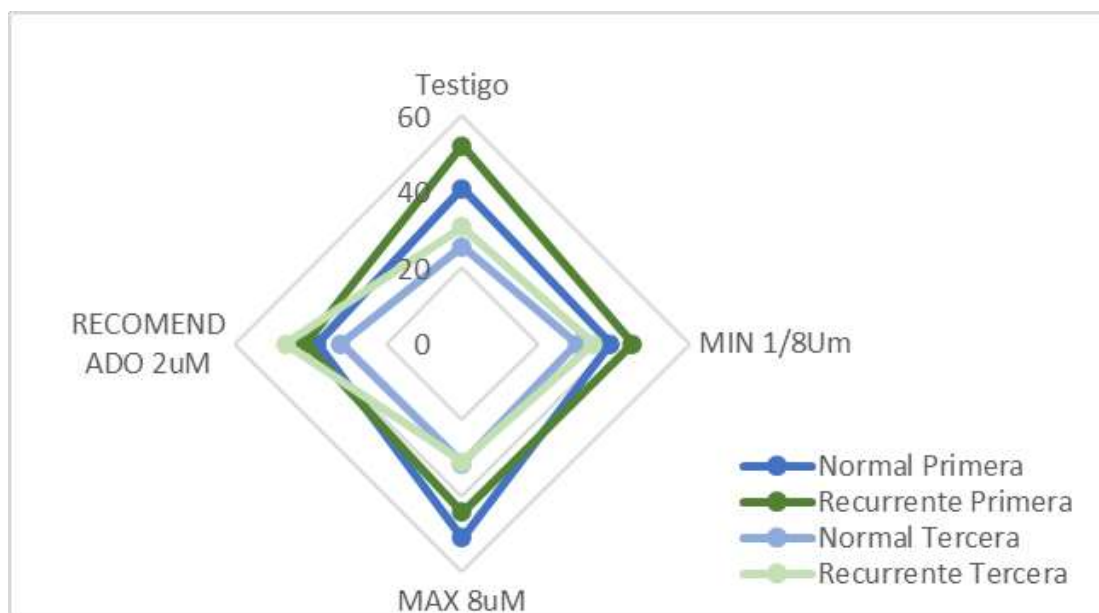
Nota. La figura presenta la variación de la motilidad progresiva postcongelación en función del tratamiento y el tipo de colecta. La concentración de 2 μ M de cafeína mostró el mayor porcentaje de progresividad en la tercera colecta recurrente. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Elaboración propia. Este comportamiento sugiere que el efecto de la cafeína no es uniforme, sino que se potencia en condiciones donde el semen ha sido sometido a mayor exigencia fisiológica como en colectas recurrentes, donde el plasma seminal presenta una disminución de sus componentes energéticos y protectores.

Cuando el equilibrio del medio seminal se ve comprometido, la cafeína actúa como un agente estimulante que mejora la funcionalidad espermática, incrementando la progresividad. Esto evidencia un efecto diferencial, siendo la cafeína más efectiva en condiciones de estrés o desgaste espermático en semen ovino inmaduro. (Arias Durán, 2024).

Figura 5

Variación de la linealidad espermática en función de los tratamientos con cafeína y tipo de colecta.





Nota. La linealidad espermática corresponde al índice LIN obtenido durante la evaluación cinética de los espermatozoides postcongelación. Aunque se observaron variaciones entre tratamientos y tipos de colecta, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Elaboración propia.

En cuanto a la variación de la linealidad espermática en función de los tratamientos con cafeína y tipo de colecta observada en la Figura 5, no existen diferencias ($p > 0,05$); no obstante, de manera visual se evidencia un comportamiento favorable en el tratamiento de la cafeína en condiciones recurrentes. Estos resultados sugieren que, aunque no hay significancia estadística, la cafeína podría ejercer un efecto positivo en condiciones de equilibrio del medio seminal, actuando como modulador del funcionamiento espermático. (Carvajal-Serna et al., 2018).

4. DISCUSIÓN

En el efecto general de la cafeína, el ANOVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Este hallazgo coincide con Castro et al. (2016), quienes en semen bovino reportan que la cafeína mejora la motilidad, pero no afecta la viabilidad ni la integridad de la membrana. Así mismo, Nikitaras et al. (2022) señalan que los efectos de la cafeína son variables según especie y concentración, pudiendo no ser significativo en algunos parámetros. De igual forma, Ahmed et al. (2023) reportaron que la adición de cafeína (0.5 mM) en el diluyente mejoró la motilidad y la viabilidad espermática postdescongelación en semen bovino, aunque con menos efectividad que otros antioxidantes como el extracto de té verde.



En cuanto al tiempo de colecta, el factor colecta mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.05$) en todas las variables. Esto se explica por la duración de la espermatogénesis en ovinos, aproximadamente 49 días desde espermatogonia hasta espermatozoide maduro, con tránsito epididimario de 10-14 días (Carvajal-Serna et al., 2018). Dicho esto, el intervalo óptimo de descanso es de 48 horas, considerado el tiempo mínimo recomendado entre colectas para permitir la recuperación.

Cabe señalar que en la pubertad de un carnero sano puede realizar entre un rango de 6-10 montas fértiles por día, aunque la calidad disminuye con frecuencias superiores a 2–3 extracciones por semana. Lo ideal son dos colectas semanales, ya que con frecuencia se compromete la muestra seminal. (Montes-Garrido et al., 2022).

En cuanto a los valores de progresividad en el análisis diferenciado por colecta, la motilidad progresiva mostró diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$), con valores representados según parámetro, valor y condición. El mínimo siendo 14.1% que es el testigo/colecta normal, y el máximo de 49.1% con una condición de 2 μM cafeína/colecta recurrente. Según Carvajal-Serna et al. (2018), valores $>40\%$ postdescongelación se considera aceptables para ovinos, mientras que $<20\%$ indican baja calidad (Spanner et al., 2024).

Nuestro valor mínimo (14.1%) está por debajo del rango esperado, pero el máximo (49.1%) alcanza niveles comparables a semen de buena calidad.

La mala calidad seminal postdescongelación se asocia con el estrés oxidativo, Durante la criopreservación se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan lípidos de membrana, proteínas y (ADN). Las mitocondrias son especialmente vulnerables a la congelación; el daño en la membrana interna reduce la producción de (ATP) y, por ende, la motilidad (Kaltsas, 2023).

La calidad seminal postdescongelación depende de múltiples factores. Madeja et al. (2021) demostraron que el contenido y la actividad mitocondrial son marcadores clave de esta calidad. Asimismo, García-Álvarez et al. (2020) reportaron que los parámetros cinéticos como la progresividad son los más afectados durante la criopreservación.

En el presente estudio, la actividad mitocondrial evaluada con MitoTracker Green FM (Invitrogen™) mostró valores variables entre tratamientos. Los valores más altos se registraron en colectas normales de tercera extracción para los tratamientos con 8 μM (47.0%) y 0.125 μM (37.3%), aunque sin diferencia significativa ($p = 0.067$). Este



valor cercano al umbral sugiere una tendencia que podría confirmarse con un mayor número de repeticiones.

La prueba MitoTracker Green FM (Invitrogen™) es un colorante fluorescente que se acumula en mitocondrias independientes del potencial de membrana, permitiendo cuantificar la masa mitocondrial total. Henning et al. (2019) validaron el uso de MitoTracker Green FM en espermatozoides, demostrando que es una herramienta confiable para estudios de funcionalidad espermática y que los espermatozoides marcados pueden ser utilizados exitosamente en ensayos competitivos de unión al oviducto.

Sin embargo, la actividad mitocondrial se relaciona directamente con la funcionalidad del espermatozoide, ya que la producción de energía influye sobre la motilidad, integridad de la membrana y estabilidad del (ADN) espermático. En este contexto, la cafeína podría favorecer la respuesta metabólica en espermatozoides con capacidad funcional conservada, especialmente en semen sometido a desgaste fisiológico. Esto podría explicar las tendencias favorables observadas en la motilidad progresiva y actividad mitocondrial.

Por ello, la cafeína representa un compuesto de interés en la criopreservación seminal, ya que puede influir en la actividad mitocondrial y la funcionalidad espermática. Su efecto parece depender del estado fisiológico del semen y de la respuesta celular frente al estrés postcongelación.

5. CONCLUSIÓN

La presente investigación evaluó el efecto postcongelación de diferentes concentraciones de cafeína sobre la calidad seminal de semen ovino inmaduro. Los resultados mostraron que las dosis utilizadas no generaron diferencias estadísticas significativas en la mayoría de variables evaluadas, sin embargo, se evidencio un efecto positivo en la motilidad progresiva durante la tercera colecta recurrente con la dosis de 2 μ M.

Estos hallazgos indican que la cafeína puede actuar como un estimulante de la funcionalidad espermática en condiciones de mayor desgaste fisiológico y alteraciones del equilibrio del plasma seminal. Por esta razón, la hipótesis planteada se la considera parcialmente, debido a que no se observaron mejoras generales en todos los parámetros seminales analizados.



Finalmente, se recomienda desarrollar futuras investigaciones con un mayor número de animales y diferentes concentraciones de cafeína, con el fin de ampliar el conocimiento sobre su aplicación en la crío preservación de semen ovino inmaduro.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Jefatura de Vinculación con la Sociedad por el respaldo fundamental otorgado al proyecto "Reactivación Ovina mediante la Implementación de un Banco de Germoplasma". Es gracias al impulso de estos proyectos de extensionismo que como investigadores podemos ejecutar estudios de gran alcance técnico y científico, generando soluciones reales para la comunidad. Valoramos profundamente su gestión y el constante apoyo institucional para hacer posible este tipo de iniciativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, D. E., El-Bawab, I. E., & El-Amrawi, G. A. (2023). Enhancement of cryopreserved Brown Swiss bull semen quality using different antioxidants. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 79(1), 142–149.
- Arias Durán, C. A. (2024). *Manual de procedimientos para la colecta y evaluación de la calidad seminal, de semen fresco y refrigerado de los reproductores del criadero San Antonio en Manizales–Caldas* [Tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia]. Repositorio Institucional de la Universidad Cooperativa de Colombia. <https://repository.ucc.edu.co/>
- Asanza-Domínguez, K. P., Moscoso Piedra, A. L., Maldonado Cornejo, M. E., & Alvarado Alvarado, J. C. (2025). Variación de los efectos de la melatonina sobre la motilidad y funcionalidad del semen ovino refrigerado. <https://doi.org/10.70208/3007.8245.v6.n1.351>
- Carvajal-Serna, M., Cortés-López, H. A., Manrique-Perdomo, C., & Grajales-Lombana, H. A. (2018). Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Revista de Medicina Veterinaria*, (36), 49–61. <https://doi.org/10.19052/mv.5171>
- Castro, L. S., Hamilton, T. R. S., Mendes, C. M., Nichi, M., Assumpção, M. E. O. A., & Visintin, J. A. (2016). Effect of caffeine on bovine sperm function and oxidative stress under cryopreservation conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 6–12. <https://doi.org/10.1111/rda.12637>



- Farfán-Alvarado, K. D. (2025). Determinación del efecto postcongelación de microdosis de menaquinona-4 en semen ovino. *MQRInvestigar*, 9(3). <https://doi.org/10.56048/MQR20225.9.3.2025.e903>
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Ramón, M., & Soler, A. J. (2020). Kinematic analysis of ram spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Animal Reproduction Science*, 218, 106482.
- Henning, H., Petrunkina, A. M., Harrison, R. A. P., & Waberski, D. (2019). Validation of MitoTracker Green FM for mitochondrial mass assessment in boar spermatozoa and its application in competitive oviduct binding assays. *Theriogenology*, 137, 131–141.
- Kaltsas, A. (2023). Oxidative stress and male infertility: The protective role of antioxidants. *Medicina*, 59(10), 1769. <https://doi.org/10.3390/medicina59101769>
- Khosravizadeh, Z., Khodamoradi, K., Rashidi, Z., Jahromi, M., Shiri, E., Salehi, E., & Talebi, A. (2022). Sperm cryopreservation and DNA methylation: Possible implications for ART success and the health of offspring. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39, 1815–1824. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02545-6>
- Lema Guamán, M. F., Maldonado Cornejo, M. E., Alvarado Alvarado, J. C., & Moscoso Piedra, A. L. (2025). Evaluación del efecto combinado de la menaquinona-4 y L-carnitina sobre la crioconservación de semen ovino. *ASCE*, 4(3), 1906–1926. <https://doi.org/10.70577/ASCE/1906.1926/2025>
- Madeja, Z. E., Pawlak, P., & Piliszek, A. (2021). Mitochondrial content and activity as markers of sperm quality in cryopreserved semen. *Reproductive Biology*, 21(2), 100498.
- Montes-Garrido, R., Risopatrón, J., & Sánchez, R. (2022). Efecto de la frecuencia de colecta sobre parámetros espermáticos en semen ovino criopreservado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(4), e23456.
- Nikitaras, M. N., Antonopoulou, E., & Kouretas, D. (2022). The role of caffeine on sperm parameters and its potential as an antioxidant during cryopreservation: A review. *Cryobiology*, 104, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.08.002>



Obayashi, Y., & Sato, T. (2020). Caffeine as a potential protective agent against oxidative stress in sperm cells. *Andrology*, 8(4), 909–916. <https://doi.org/10.1111/andr.12781>

Spanner, E. A., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2024). Factors affecting the success of laparoscopic artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 264, 107453. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107453>

Suqui Pinos, M. X., Maldonado Cornejo, M. E., Alvarado Alvarado, J. C., & Moscoso Piedra, A. L. (2026). Evaluación de la curva de sobrevivencia espermática en un cooler en diferentes intervalos de tiempo. *Revista Multidisciplinar Epistemología de las Ciencias*, 3(1). <https://doi.org/10.71112/sq9xaa64>

Trejo Córdova, A. (2025). Calidad seminal en ovinos Katahdin: Efecto de la frecuencia de colecta y número de eyaculados en semen fresco y postdescongelado. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 28(3).

CONFLICTO DE INTERESES

No existe.

FINANCIAMIENTO

No aplica.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Conceptualización: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri, Manuel Maldonado Cornejo.

Curación de datos: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri.

Análisis formal: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri, Juan Carlos Alvarado Alvarado.

Investigación: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri, Andrés Leonardo Moscoso Piedra.

Metodología: Manuel Maldonado Cornejo, Juan Carlos Alvarado Alvarado.

Administración del proyecto: Manuel Maldonado Cornejo.

Recursos: Manuel Maldonado Cornejo, Juan Carlos Alvarado Alvarado, Andrés Leonardo Moscoso Piedra.

Software: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri, Andrés Leonardo Moscoso Piedra.

Supervisión: Manuel Maldonado Cornejo, Juan Carlos Alvarado Alvarado.

Validación: Juan Carlos Alvarado Alvarado, Andrés Leonardo Moscoso Piedra.

Visualización: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri.

Redacción – borrador original: Jeandry Alexander Aguilar Tacuri.

Redacción – revisión y edición: Manuel Maldonado Cornejo, Juan Carlos Alvarado Alvarado, Andrés Leonardo Moscoso Piedra.

