

DOI: <https://doi.org/10.70208/3007.8245.v6.n1.351>

Variación de los efectos de la melatonina sobre la motilidad y funcionalidad del semen ovino refrigerado

Karen Paola Asanza Dominguez

karen.asanza.05@est.ucacue.edu.ec<https://orcid.org/0009-0006-0304-0640>

Universidad Católica de Cuenca

Andres Leonardo Moscoso Piedra

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

Universidad Católica de Cuenca

Manuel Maldonado Cornejo

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

Universidad Católica de Cuenca

Juan Carlos Alvarado Alvarado

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

Universidad Católica de Cuenca

RESUMEN

La melatonina es un potente antioxidante indolamínico que protege la integridad de las membranas celulares frente al estrés oxidativo y estabiliza la funcionalidad mitocondrial. Determinar la dosis funcional de melatonina sobre el semen ovino refrigerado a partir de la variación de su efecto sobre la motilidad y funcionalidad espermática fue el objetivo de este estudio, evaluando diversas concentraciones sobre semen de carneros Katahdin y Blackbelly a 5 °C. Se utilizó una escala logarítmica desde 1/16 mM hasta 16 mM, con 8 repeticiones durante 2, 4 y 24 horas. Los resultados demostraron que la melatonina actúa de forma dosis-dependiente bajo un modelo polinómico de segundo grado en función de $\log_2$ alcanzando su máxima eficacia biológica a las 4 horas. En este periodo, se registraron valores óptimos de vitalidad (80%) con 1,46 mM, progresividad (40,20%) con dosis cercanas a 16 mM y linealidad (38,06%) con 0,5 mM. El comportamiento parabólico de la linealidad advierte un efecto bifásico, donde concentraciones excesivas resultan contraproducentes para la cinemática celular. Se concluye que una concentración de 1,5 mM representa el equilibrio óptimo para preservar la estructura y el desplazamiento del espermatozoide ovino en estas razas, siendo la dosis sugerida para su posterior crioconservación.

Palabras clave: Melatonina., criopreservación., linealidad., vitalidad., progresividad



Variation of the effects of melatonin on the motility and functionality of chilled ovine semen

ABSTRACT

Melatonin is a potent indolaminic antioxidant that protects cell membrane integrity against oxidative stress and stabilizes mitochondrial functionality. To determine the functional dose of melatonin on chilled ram semen based on the variation of its effect on motility and sperm functionality was the objective of this study, evaluating various concentrations on Katahdin and Blackbelly ram semen at 5 °C. A logarithmic scale from 1/16 mM to 16 mM was used, with 8 replicates during 2, 4, and 24 hours. Results demonstrated that melatonin acts in a dose-dependent manner under a second-grade polynomial model as a function of $\log_2$, reaching its maximum biological efficacy at 4 hours. During this period, optimal values were recorded for vitality (80%) with 1.46 mM, progressivity (40.20%) with doses near 16 mM, and linearity (38.06%) with 0.5 mM. The parabolic behavior of linearity warns of a biphasic effect, where excessive concentrations are counterproductive for cellular kinematics. It is concluded that a concentration of 1.5 mM represents the optimal balance to preserve the structure and displacement capacity of the ovine sperm in these breeds, being the suggested dose for subsequent cryopreservation.

Keywords: Melatonin, cryopreservation, linearity, vitality, progressiveness



INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de mamíferos presentan una vulnerabilidad inherente al estrés oxidativo, fenómeno caracterizado por un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes que resulta en un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) del tracto genital masculino. Esta alteración compromete a la integridad espermática, manifestándose a través de la peroxidación de proteínas de lípidos de membrana, la oxidación de proteínas y el daño al ácido desoxirribonucleico (Casao et al., 2009).

Por ello que se han realizado diversas investigaciones para contrarrestar este problema. Un estudio realizado por Widyastuti et al. (2024) tuvo como objetivo determinar el efecto de la suplementación con melatonina en los parámetros de calidad del espermatozoide de ciervos y los niveles de expresión de genes antioxidantes en diluyentes de semen durante el almacenamiento en frío. Se evaluaron diferentes concentraciones: control, 0,1; 0,2 y 0,3mM. Posteriormente, el semen tratado se almacenó a 5 °C durante 72 h. Los resultados mostraron que la concentración de 0,2 mM permitió mantener los parámetros cinéticos.

Asimismo, un estudio realizado por Hernández (2024) desarrolló un análisis del efecto de diferentes concentraciones de melatonina (0; 1.5 y 3.5 mM) en semen de caprinos de raza Saneen crío preservado. Los resultados evidenciaron que, tras la congelación y descongelación no hubo diferencias significativas en motilidad progresiva, funcionalidad de membrana e integridad del acrosoma; sin embargo, el movimiento de onda fue mayor en los tratamientos con melatonina en comparación al control.

Por otro lado, Flores y sus colaboradores (2017) evaluaron el efecto antioxidante de la melatonina en la conservación de semen porcino a 16 °C. Utilizaron semen de verracos de 7 a 18 meses, comparando un grupo control y otro tratado con melatonina (1,25 mM). Los resultados evidenciaron una reducción del malondialdehído y un aumento de la actividad del superóxido dismutasa, lo que indicó un efecto antioxidante beneficioso durante la conservación seminal.

La melatonina es una hormona clave en la regulación de la estacionalidad reproductiva en carneros, y ha sido detectada tanto en los testículos como en el plasma seminal, con receptores específicos en los



espermatozoides (Jiménez et al. 2018) . Esta evidencia sugiere que podría ejercer un rol directo en procesos como la capacitación espermática y la protección contra la apoptosis celular. La viabilidad del semen durante la refrigeración representa un verdadero desafío en la inseminación artificial. A diferencia de otras especies, la refrigeración de dosis seminales para la inseminación artificial en ovinos no ha alcanzado un desarrollo comparable, principalmente debido a las bajas tasas de fertilidad, que rondan el 50%(Tiwari et al., 2022) . Por lo tanto, el uso de melatonina podría constituir una alternativa eficaz para mejorar la calidad y longevidad espermática. Por ello, resulta pertinente estudiar su efecto en el semen refrigerado de carneros como una posible estrategia para optimizar las biotecnologías reproductivas en ovinos (Jiménez et al., 2018) .

Para el presente estudio se planteó determinar la dosis funcional de melatonina sobre el semen ovino refrigerado a partir de la variación de su efecto sobre la motilidad y funcionalidad espermática; en este contexto, se evaluó la funcionalidad y motilidad espermática del semen ovino refrigerado con diferentes concentraciones, con el fin de determinar la dosis óptima en función de la viabilidad, progresividad y linealidad espermática.

La criopreservación de semen es una herramienta útil para preservar la fertilidad y se emplea comúnmente antes de su uso en técnicas de reproducción asistida, como la fertilización in vitro y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Naella et al., 2004). La calidad del semen almacenado tras la descongelación puede disminuir por daño celular, estrés oxidativo y alteración de membranas. Otra causa asociada es la criolesión mitocondrial, considerada una de las principales responsables de la baja calidad espermática tanto del semen congelado como descongelado, debido a la función esencial de las mitocondrias en el suministro de energía y su baja tolerancia a la descongelación (Zhang et al., 2024).

Para reducir estos efectos se han probado nuevos antioxidantes, entre ellos la melatonina (N-acetil-5-metoxiriptamina), hormona con potente acción antioxidante capaz de neutralizar radicales libres y favorecer la actividad de enzimas que mantienen el equilibrio redox y la integridad de las membranas celulares (Yadav et al., 2023). Además, se ha demostrado eficacia en la protección celular frente al



estrés oxidativo (Flores et al., 2018). En el ámbito reproductivo, se utiliza como aditivo en extensores de semen debido a su capacidad para proteger a los espermatozoides del daño oxidativo durante la congelación y descongelación, mejorando parámetros como la motilidad, la viabilidad y el potencial mitocondrial (Yadav et al., 2023).

Este antioxidante participa en la fertilidad del carnero actuando desde la espermatogénesis hasta la eyaculación. Mejora la calidad seminal al aumentar el flujo sanguíneo mediante la disminución de la resistencia vascular, lo que favorece la concentración y motilidad espermática, así como la espermatogénesis (Shahat, Thundathil & Kastelic, 2022). Además, actúa sobre células germinales y de Leydig a través de sus receptores MT1, MT2 y ROR α , desempeñando un papel fundamental en la salud reproductiva masculina. También contribuye a la diferenciación celular y a la producción de testosterona, ofreciendo protección antioxidante. La síntesis local en el testículo y el epidídimo es clave para la maduración espermática, la función epitelial y la secreción epididimaria. En el plasma seminal resulta vital para mantener el equilibrio redox, proteger a los espermatozoides del daño y modular su capacitación mediante el control de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (Casao, Peña & Pérez, 2025).

Los principales parámetros como vitalidad, motilidad y funcionalidad son esenciales en la evaluación del material seminal, ya que indican si los espermatozoides están vivos y si pueden desplazarse de forma efectiva. La vitalidad refleja la integridad de la membrana celular, mientras que la motilidad es indispensable para que los espermatozoides avancen por el tracto reproductivo y alcancen el ovocito. Ambos parámetros están directamente relacionados con el potencial de fertilización. (Sunder & Leslie, 2025).

El empleo de semen refrigerado es una estrategia habitual en los programas de reproducción ovina, ya que permite conservar su viabilidad durante periodos cortos y facilita su traslado a diferentes unidades de producción. En carneros, mantener las dosis seminales aproximadamente a 15 °C permite conservar su funcionalidad por varias horas, lo que resulta beneficioso para su aplicación en campo, especialmente cuando es necesario transportarlo a zonas alejadas (Tisalema et al., 2024) . No



obstante, el proceso de enfriamiento debe realizarse cuidadosamente, ya que los espermatozoides ovinos son especialmente sensibles a los cambios bruscos de temperatura (Durá, 2023).

Esta susceptibilidad se debe a la composición particular de su membrana celular, caracterizada por un bajo contenido de colesterol, lo que disminuye su resistencia ante variaciones térmicas. Cuando la temperatura desciende de forma abrupta, pueden producirse alteraciones como pérdida de motilidad, daño estructurales de la membrana, incremento del estrés oxidativo e incluso procesos celulares no deseados, como la capacitación prematura o la apoptosis (Jiménez et al., 2018) .

Con base a este marco, se propuso definir la dosis óptima de melatonina en semen fresco ovino como fundamento para su aplicación en biotecnologías reproductivas ovinas, bajo la hipótesis de que esta molécula tiene un comportamiento dosis-dependiente y no lineal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, ubicada en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, Ecuador.

En donde se emplearon diez tratamientos correspondientes a distintas concentraciones de melatonina (1/16 mM, 1/8 mM, 1/4 mM, 1/2 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM y 16 mM), además de un grupo control sin antioxidante. El tamaño muestral efectivo estuvo constituido por seis eyaculados ($n = 6$), tres obtenidas de un carnero de raza Katahdin y tres de un carnero de raza Black Belly, ambos adultos, clínicamente sanos de fertilidad probada y mantenidos bajo condiciones homogéneas de manejo. La muestras seminales de estos animales fueron similares con una concentración de $4,5 \times 10^6$ de espermatozoides con una motilidad masal de 90% controlando así la variabilidad de las muestras de los sementales. Cada unidad seminal fue fraccionada en alícuotas, tratadas con las diferentes concentraciones y posteriormente refrigeradas a 5 °C para su análisis a las 2, 4 y 24 horas posteriores al tratamiento.



Fase de campo

Para la colección de semen se usó una vagina artificial que contenía agua entre 42°C y 44°C con una cantidad de 50 ml. Se agregó aire en el interior de la camisa de látex hasta llegar a un centímetro de grosor, lo que facilitó la colecta. En el extremo del cuello de la vagina artificial se colocó un tubo colector estéril falcón de 15ml. El operario se coloca a lado derecho de la oveja y sostiene la vagina artificial en un ángulo de 40°C, el macho realiza el efecto flehmen y hace el golpe de riñón siendo un indicativo de la eyaculación, la muestra seminal se sostiene con la mano a temperatura corporal de 37°C evitando así el contacto con la luz ultravioleta y cambios de temperatura hasta llegar al laboratorio de acuerdo con las recomendaciones de (Lema et al., 2025).

Fase de laboratorio

Se evaluaron las características macroscópicas del semen fresco, registrándose un volumen promedio de $1,2 \pm 0,2$ ml por colecta, con apariencia blanco lechosa, olor neutro y ausencia de impurezas. En la evaluación microscópica se obtuvo una motilidad masal superior al 80% y una concentración espermática comprendida entre 4000×10^6 y 4500×10^6 espermatozoides/ml, valores determinados mediante un fotómetro SMD (Minitube) para ovinos. Para la predilución se utilizó el diluyente Triladyl® (Minitube), cuya formulación incluye yema de huevo, compuesta por lipoproteínas y fosfolípidos que contribuyen a la protección de la membrana plasmática espermática, como lo indican Farfán, Moscoso & Alvarado (2025). Se colocó 100 µL alícuota de cada tratamiento con 900 µL de solución madre posteriormente se refrigeró a 5 °C para su evaluación posterior (Paucar et al. 2025).

Análisis instrumental

Valdez, Moscoso & Maldonado (2024) sugieren el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) utilizando un portaobjetos con 5 µL y un cubreobjetos para el registro digital y análisis de los parámetros cinemáticos espermáticos, cada muestra se mantuvo a 37 °C durante la lectura. La viabilidad se determinó mediante la prueba de Eosina–Nigrosina, mezclando 3 µL de semen con igual volumen de colorante en donde los espermatozoides vivos permanecieron incoloros, mientras que los muertos se tiñeron de rosa. Se contaron 100 células por muestra.



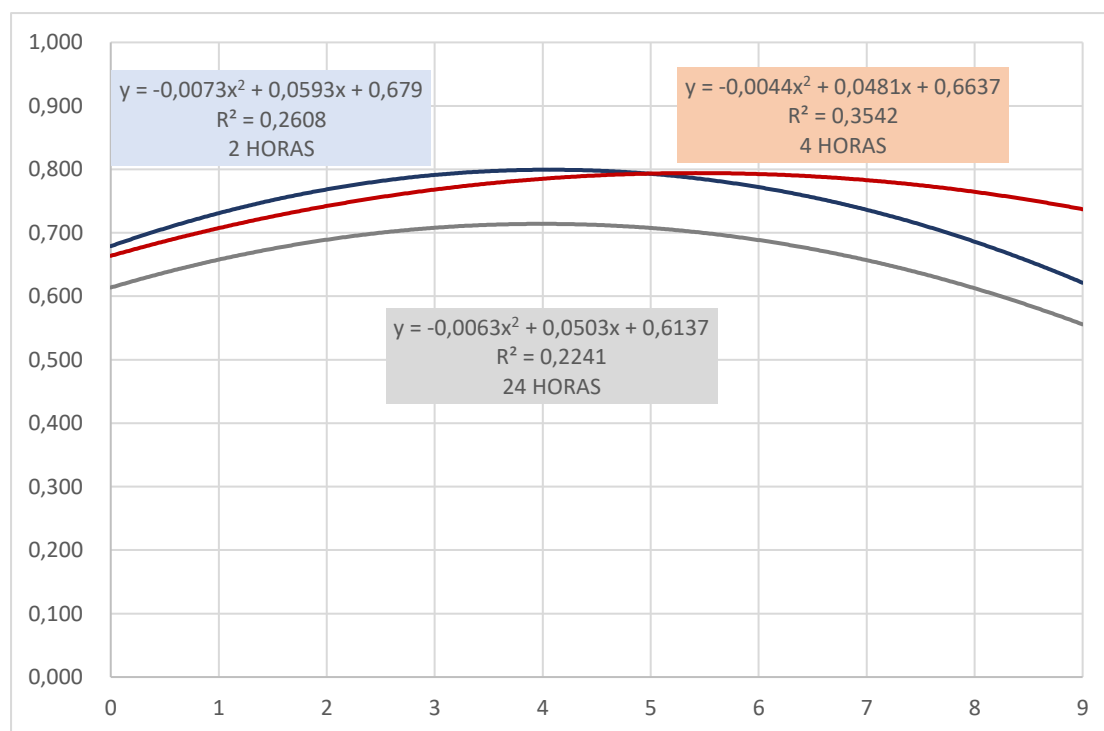
Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron en el software InfoStat 2020®, aplicando un ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para determinar el efecto de las concentraciones de melatonina y el tiempo de almacenamiento sobre los parámetros seminales. Las diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$) y finalmente, se elaboró una curva de regresión polinómica cuadrática en función de Log_2 para estimar la dosis óptima de melatonina, obteniéndose los puntos máximos de motilidad progresiva, linealidad y viabilidad espermática.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez verificada la homogeneidad de las muestras de los tres ovinos donadores, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre las diversas dosis de Melatonina sobre las variables de permeabilidad, progresividad y cinética espermática, evaluadas en semen fresco diluido y refrigerado. Los resultados obtenidos se describen a continuación:

Figura 1: Curva del efecto de la melatonina sobre la Vitalidad a las 2, 4 y 24 horas de refrigeración a 5°C

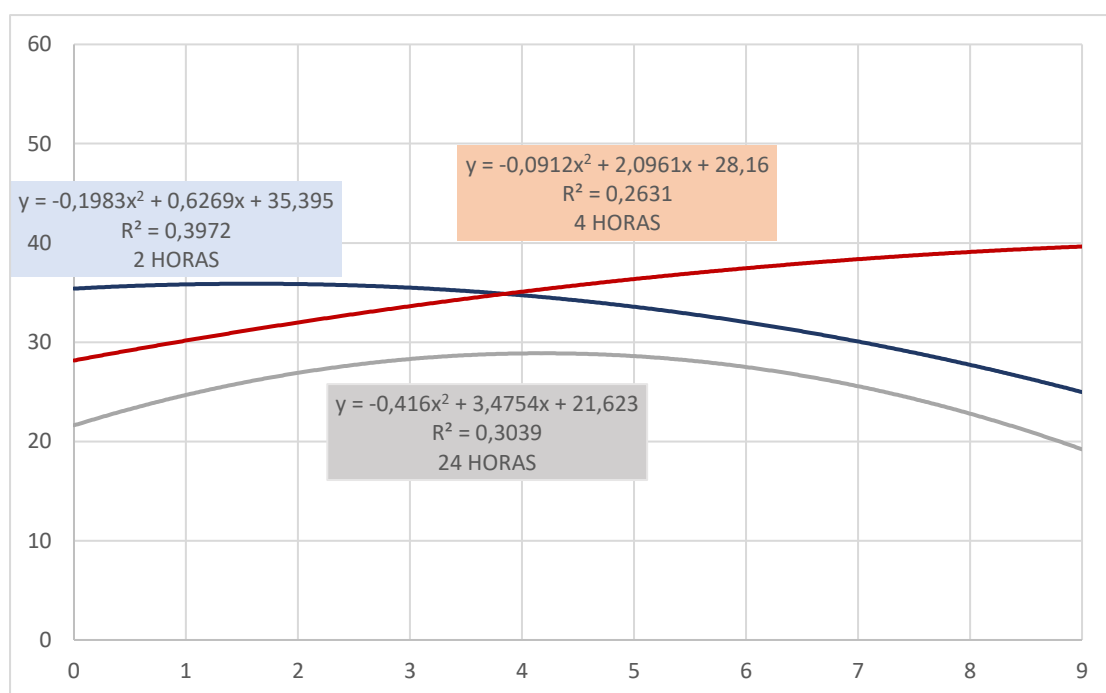


La figura 1 muestra el efecto de las diferentes dosis (mM) sobre el porcentaje de espermatozoides vivos evaluado a las 2, 4 y 24 horas. Los datos se ajustaron a modelos polinómicos de segundo grado,



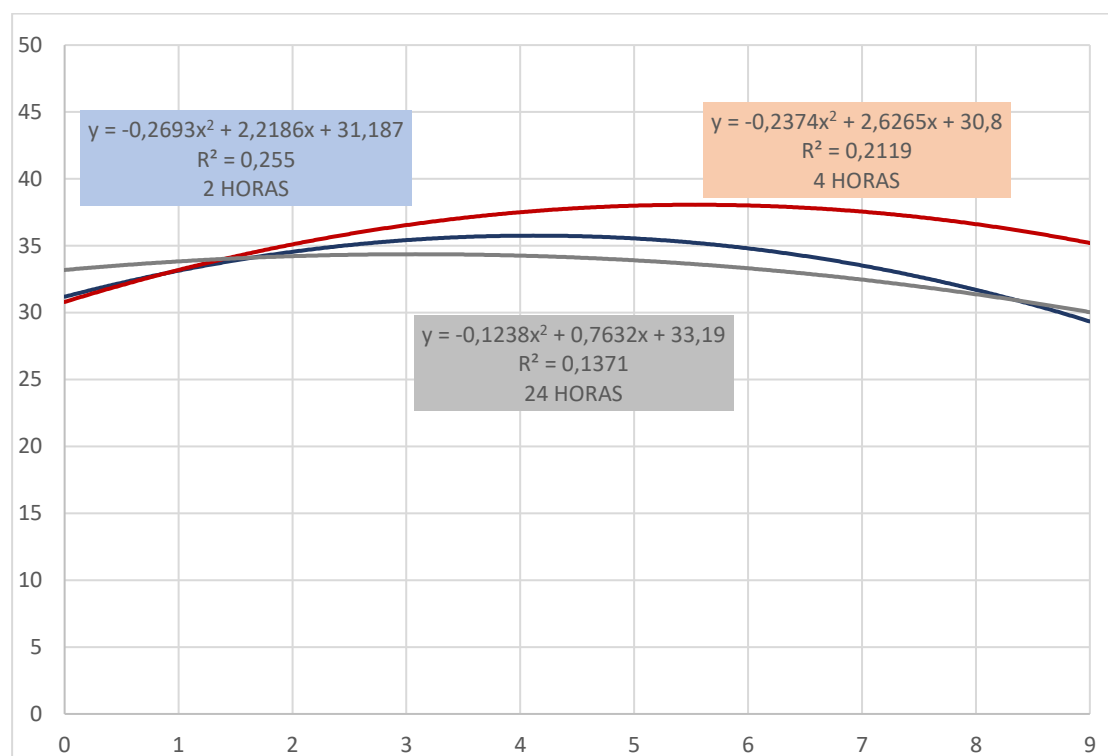
evidenciando un comportamiento dosis dependiente. El mayor valor de viabilidad se registró a las 4 horas ($Y = 0,80$), alcanzado con una dosis interpolada cercana a 1,46 mM. En las evaluaciones a las 2 y 24 horas, los valores máximos se obtuvieron con dosis inferiores a 0,6 mM, manteniéndose porcentajes de viabilidad superiores al 70%. A concentraciones mayores se observó una disminución progresiva del porcentaje de espermatozoides vivos.

Figura 2: Curva del efecto de la melatonina sobre la *progresividad a las 2, 4 y 24 horas de refrigeración a 5°C*



La Gráfica 2 presenta el comportamiento de la progresividad espermática en función de las dosis evaluadas a las 2, 4 y 24 horas. Se observó un ajuste polinómico de segundo grado en los tres tiempos de evaluación. El mayor valor de progresividad se registró a las 4 horas, alcanzando un máximo de 40,20% con una dosis estimada cercana a 16 mM. En contraste, a las 2 y 24 horas los valores máximos de progresividad fueron inferiores y se alcanzaron con dosis menores a 1 mM, evidenciándose una reducción progresiva de esta variable a concentraciones superiores.

Figura 3: Curva del efecto de la melatonina sobre la *linealidad a las 2, 4 y 24 horas de refrigeración a 5°C*



La Gráfica 3 muestra la respuesta del porcentaje de linealidad del movimiento espermático (%LIN) frente a las distintas dosis evaluadas a las 2, 4 y 24 horas. En los tres tiempos se observó un comportamiento parabólico, con un máximo claramente definido. El mayor valor de %LIN se registró a las 4 horas ($Y = 38,06\%$), alcanzado con una dosis interpolada cercana a 0,5 mM. A partir de esta concentración, el porcentaje de linealidad disminuyó progresivamente tanto a las 2 como a las 24 horas.

Tabla 1: Resumen de valores óptimos en la curva de Melanina

	Ecuación	X máximo	Y máximo	mmoles (interpolado)
Vivos	2 Horas	4,06	0,80	0,53
	4 Horas	5,46	0,80	1,46
	6 Horas	3,99	0,71	0,49
Progresivos	2 Horas	1,58	35,89	0,10
	4 Horas	11,49	40,20	>16
	6 Horas	4,17	28,88	0,58
%LIN	2 Horas	4,20	35,75	0,55
	4 Horas	5,53	38,06	1,50
	6 Horas	3,08	34,36	0,27

En resumen, la vitalidad espermática, el mejor tratamiento en donde se obtuvo a las 4 horas con una dosis aproximada de 1,5 mM, alcanzando un 80% de espermatozoides vivos. Respecto a la progresividad espermática, el mayor valor se registró a las 4 horas con una dosis cercana a 16 mM, logrando una progresividad de 40,20%. Finalmente, en la cinemática espermática, expresada como porcentaje de linealidad, el mejor tratamiento se observó a las 4 horas con una dosis aproximada de 0,5 mmol, alcanzando un valor de 38,06% (Tabla 1)

DISCUSIÓN

La motilidad progresiva máxima registrada en el presente estudio se situó entre 35 % y 40 %, mientras que la vitalidad alcanzó valores cercanos al 80 % y la linealidad del movimiento espermático (LIN %) llegó aproximadamente al 38 % durante las primeras cuatro horas de refrigeración. Estos valores sirven como referencia para interpretar el efecto de la melatonina, ya que en ausencia de esta molécula o cuando se emplean concentraciones elevadas, los parámetros seminales tienden a disminuir. En dichas condiciones, la motilidad progresiva puede reducirse a 20–25 %, la vitalidad a 60 % y la linealidad alrededor de 30 %.

Resultados similares han sido descritos en investigaciones previas Ji et al. (2024) y Manchevet al., (2014) evaluaron el uso de antioxidantes en semen ovino refrigerado en carneros Hu y de razas mediterráneas con marcada estacionalidad reproductiva. Estos autores reportaron que, aunque los antioxidantes puedan disminuir el daño oxidativo y contribuir a preservar la calidad espermática, las mejoras en los parámetros de motilidad suelen ser moderadas durante el almacenamiento enfriado. Este comportamiento coincide con lo observado en el presente estudio, donde la progresividad espermática puede verse limitada por factores como el estrés térmico y la elevada sensibilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides ovinos.

En relación con el efecto específico de la melatonina, la vitalidad espermática obtenida en esta investigación muestra concordancia con lo reportado por Dai et al. (2019). Estos autores indicaron que la adición de melatonina en concentraciones entre 0,05 mM y 0,2 mM durante el almacenamiento a 4 °C no genera diferencias estadísticas significativas en algunos parámetros seminales; sin embargo, contribuye a mantener un mayor porcentaje de espermatozoides viables en comparación con el grupo



control. Asimismo, algunos estudios sugieren que concentraciones cercanas a 1,5 mM pueden asociarse con mejores valores de vitalidad y progresividad espermática. Este efecto se relaciona con la capacidad antioxidante de la melatonina, la cual protege la membrana plasmática frente al daño oxidativo inducido por la refrigeración.

De acuerdo con lo descrito por Dai et al. (2019), Manchev et al. (2014) y Ji et al. (2024), la melatonina parece actuar principalmente preservando la integridad estructural de los espermatozoides frente al estrés oxidativo, mientras que los parámetros cinemáticos pueden verse más influenciados por la concentración utilizada y el tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la linealidad del movimiento espermático (LIN %), en el presente estudio se observó una tendencia de tipo parabólico en función de las concentraciones de melatonina evaluadas a las 2, 4 y 24 horas de refrigeración. Para este parámetro se estimó un valor óptimo cercano a 0,5 mM, lo que sugiere que existe una concentración específica capaz de favorecer la trayectoria rectilínea del espermatozoide durante las primeras etapas del almacenamiento en frío. Este comportamiento resulta relevante, ya que el parámetro LIN mostró valores relativamente similares a lo largo de los diferentes tiempos de evaluación.

Durante el proceso de almacenamiento, es común que los espermatozoides pierdan gradualmente la capacidad de desplazarse en línea recta, lo que se refleja en la disminución de parámetros como LIN y VSL. Sin embargo, la motilidad global puede mantenerse debido a la conservación de la velocidad curvilínea y del movimiento total de la población espermática. Este comportamiento ha sido descrito mediante sistemas de análisis CASA en diferentes especies domésticas, incluyendo bovinos y ovinos (Şavkay, Yalçın & Tavşanoğlu, 2020).

Por otra parte, la disminución del %LIN observada en concentraciones superiores a 0,5 mM sugiere que niveles elevados de melatonina no necesariamente generan beneficios adicionales sobre la calidad del movimiento espermático. Este fenómeno ha sido descrito en diversos modelos experimentales, donde concentraciones altas de antioxidantes pueden alterar el equilibrio redox fisiológico o interferir con procesos metabólicos relacionados con la motilidad celular. En este sentido, la reducción de la



linealidad observada a dosis elevadas podría estar asociada con un posible efecto bifásico de la melatonina (Makris et al. 2023).

A pesar de ello, concentraciones moderadas de melatonina han demostrado ejercer efectos protectores en diferentes modelos experimentales. Widyastuti et al. (2024) reportaron que la adición de 0,2 mM de melatonina en semen de machos cabríos permitió mantener los parámetros de calidad espermática hasta por 72 horas de almacenamiento, lo cual se atribuyó a su capacidad para disminuir el estrés oxidativo y preservar la integridad celular.

En conjunto, estos hallazgos indican que la melatonina actúa como un antioxidante eficaz durante la conservación del semen, aunque su efecto depende de la concentración utilizada. Dosis moderadas contribuyen a reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), preservar la integridad de las membranas celulares y favorecer parámetros asociados con una motilidad espermática más eficiente. En este contexto, el incremento del %LIN observado a las 4 horas podría reflejar un proceso de estabilización celular posterior al choque térmico inicial provocada por la refrigeración, en el cual la melatonina contribuiría a mantener el equilibrio redox intracelular (Deng et al., 2017).

CONCLUSIONES

La suplementación con melatonina mejora la calidad del semen ovino refrigerado a 5 °C de manera dosis-dependiente, alcanzando su máxima eficacia biológica a las 4 horas de almacenamiento. El uso de dosis moderadas, específicamente entre 0,5 y 1,5 mM, optimiza la vitalidad y la linealidad espermática al proteger la integridad de la membrana frente al estrés oxidativo; sin embargo, el comportamiento parabólico de los resultados advierte que concentraciones excesivas resultan contraproducentes para la cinemática celular, estableciendo la dosis de 1,5 mM como el punto de equilibrio óptimo para preservar la funcionalidad y estructura del espermatozoide ovino durante la refrigeración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Casao, A., Peña-Delgado, V., & Pérez-Pe, R. (2025). From spermatogenesis to fertilisation: the role of melatonin on ram spermatozoa. *Domestic Animal Endocrinology*, 91(106916), 106916.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2025.106916>



- Dai, G.-C., Meng, Y., Zhang, L.-K., Du, Y.-Q., Wen, F., Feng, T.-Y., & Hu, J.-H. (2019). Effect of addition of melatonin on liquid storage of ram semen at 4°C. *Andrologia*, 51(5), e13236. <https://doi.org/10.1111/and.13236>
- Deng, S.-L., Sun, T.-C., Yu, K., Wang, Z.-P., Zhang, B.-L., Zhang, Y., Wang, X.-X., Lian, Z.-X., & Liu, Y.-X. (2017). Melatonin reduces oxidative damage and upregulates heat shock protein 90 expression in cryopreserved human semen. *Free Radical Biology & Medicine*, 113, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.342>
- Durá, A. (2023). *Efecto del protocolo de refrigeración y de congelación sobre la calidad del semen criocongelado de machos cabríos*. Gva.es. https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/8947/2023_Dura_Efecto.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Farfán-Alvarado, D., Alvarado-Alvarado, J., & Moscoso-Piedra, A. (2025). Determinación Del Efecto Post Congelación De Microdosis De Menaquinona-4 En Semen Ovino. *Journal Scientific Investigar* ISSN: 2588–0659. <https://www.investigarmqr.com/ojs/index.php/mqr/article/view/2133/6225>
- Flores, C., Meléndez, C., Mendoza, C., Márquez, Y., & Vilanova, L. T. (2018). *Vista de Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo*. <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/2780/2461>
- Hernández, A. (2024). *CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CAPRINO ADICIONADO CON MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE* [UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/15c33e24-91a5-4e24-adb1-173f583b8a91/content>
- Ji, K., Jinbo, Wei, Zhiwei, Fan, Mengkang, Zhu, Xin, Yuan, Sihuan, Zhang, Shuang, Li, Han, Xu, & Ling, Y. (2024). *Preservative effects of curcumin on semen of Hu sheep*. *Animals*. <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/6/947>
- Jiménez, S. M., Gascón, A. C., Pérez, J. Á. C., Blanco, M. T. M., & Pe, R. P. (2018). Acción protectora de la melatonina frente al daño por frío en espermatozoides ovinos. *XLIII Congreso Nacional y*



XIX Congreso Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), 603–608.

- Lema Guamán, M. F., Maldonado Cornejo, M. E., Alvarado Alvarado, J. C., & Moscoso Piedra, A. L. (2025). Evaluación del Efecto Combinado de la menaquina-4 y L-Carnitina sobre la Crioconservación de Semen Ovino. *ASCE MAGAZINE*, 4(3), 1906–1926. <https://doi.org/10.70577/asce/1906.1926/2025>
- Makris, A., Alevra, A. I., Exadactylos, A., Papadopoulos, S., & Griveas, I. (2023). The Role of Melatonin to Ameliorate Oxidative Stress in Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15056. <https://doi.org/10.3390/ijms242015056>
- Manchev, S., Stefanov, R., Anev, G., Tzvetkova, P., & Maksimović, N. (2014). *Effect of melatonin on the reproductive characteristics of rams of north east Bulgarian fine fleece breed*. Comptes Rendus de l'Académie Bulgare Des Sciences. <https://r.istocar.bg.ac.rs/handle/123456789/432>
- Martín-Hidalgo, D., Barón, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., García-Marín, L. J., & Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology*, 75(8), 1550–1560. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.021>
- Motta, N. C., Egger, R. C., Monteiro, K. S., Vogel de Oliveira, A., & Solis Murgas, L. D. (2022). Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Theriogenology*, 179, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.012>
- Nallella, K. P., Sharma, R. K., Allamaneni, S. S. R., Aziz, N., & Agarwal, A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, 82(4), 913–918. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.126>
- Paucar-Quito, E., Alvarado-Alvarado, J., Moscoso-Piedra, A., & Maldonado-Cornejo, M. (2025). Evaluación de tres diluidores comerciales sobre el semen ovino post-congelación. *Polo del conocimiento*. <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/8829/pdf>



- Şavkay, O. L., Yalçın, M. E., & Tavşanoğlu, V. (2020). Sperm motility analysis system implemented on a hybrid architecture to produce an intelligent analyzer. *Informatics in Medicine Unlocked*, 19(100324), 100324. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100324>
- Shahat, A. M., Thundathil, J. C., & Kastelic, J. P. (2022). Melatonin improves testicular hemodynamics and sperm quality in rams subjected to mild testicular heat stress. *Theriogenology*, 188, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.029>
- Shayestehyekta, M., Mohammadi, T., Soltani, L., & PooyanMehr, M. (2022). Effect of different concentrations of melatonin on ram epididymal spermatozoa recovered post-mortem under oxidative stress conditions and storage at 4°C. *Zuchthygiene [Reproduction in Domestic Animals]*, 57(12), 1520–1528. <https://doi.org/10.1111/rda.14228>
- Sunder, M., & Leslie, S. W. (2025). Semen analysis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Tisalema-Shaca, M. O., Mira-Naranjo, J. M., Valle-Baldeón, S., & Lliví-Marcatoma, J. (2024). Caracterización sociocultural y económica de producción de ovinos en comunidades indígenas, Tungurahua - Ecuador. *Telos*, 26(3), 975–992. <https://doi.org/10.36390/telos263.12>
- Tiwari, S., Dewry, R. K., Srivastava, R., Nath, S., & Mohanty, T. K. (2022). Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology*, 179, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.013>
- Valdez-Pinargote, G., Moscoso-Piedra, A., & Maldonado-Cornejo, M. (2024). Efecto de la concentración de la l-carnitina en congelación del semen ovino. *Journal Scientific Investigar ISSN: 2588-0659*. <https://doi.org/10.56048/MQR20225.8.4.2024.7324-7341>
- Widyastuti, R., Prastowo, S., Jaswandi, J., Lubis, A., Setiawan, R., Ridlo, M. R., & Boediono, A. (2024). Effect of melatonin supplementation on sperm quality parameters and expression of antioxidant genes during cold storage of buck semen extenders. *Veterinary World*, 17(4), 863–870. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.863-870>
- Yadav, D. K., Kumar, A., Gupta, S., Sharma, P., Kumar, G., Sachan, V., Yadav, B., Yadav, S., Saxena, A., & Swain, D. K. (2023). Antioxidant additive melatonin in tris-based egg yolk extender improves



post-thaw sperm attributes in Haryana bull. *Animal Reproduction Science*, 251(107214), 107214.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107214>

Zhang, L., Sun, Y., Jiang, C., Sohail, T., Sun, X., Wang, J., & Li, Y. (2024). Damage to mitochondria during the cryopreservation, causing ROS leakage, leading to oxidative stress and decreased quality of ram sperm. *Zuchthygiene [Reproduction in Domestic Animals]*, 59(10), e14737.

<https://doi.org/10.1111/rda.14737>

