



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

EVALUACIÓN DE LA COENZIMA Q10 Y LA VITAMINA

K EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

AUTOR: DANNY JAVIER PILCO GAVILANES

DIRECTOR: DR. DANIEL ARGUDO, PhD.

CUENCA-ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

EVALUACIÓN DE LA COENZIMA Q10 Y LA VITAMINA

K EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN

DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

AUTOR: DANNY JAVIER PILCO GAVILANES

DIRECTOR: Dr. DANIEL ARGUDO, PhD.

CUENCA – ECUADOR

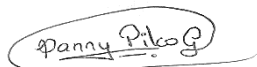
2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Yo, **Danny Javier Pilco Gavilanes**, portador de la cédula de ciudadanía N° 0606175586. Declaro ser autor de la obra: **“Evaluación de la Coenzima Q10 y la Vitamina K en la congelación de semen equino”**, sobre la cual me responsabilizo sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **3 de Julio de 2024**



Danny Javier Pilco Gavilanes

0606175586

Certificación

Yo Daniel Ernesto Argudo Garzón, con cédula de identidad N° 0104461165 en calidad de director del Trabajo de Titulación con el tema: **“Evaluación de la Coenzima Q10 y la Vitamina K en la congelación de semen equino”**, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por **DANNY JAVIER PILCO GAVILANES**, bajo mi supervisión.



Firmado electrónicamente por:
**DANIEL ERNESTO
ARGUDO GARZON**

MVZ. Daniel Argudo, Garzón.Msc

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DOCENTE DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

Agradecimiento

Agradezco a Dios por darme salud y vida para alcanzar este importante logro, a los docentes de la Universidad Católica de Cuenca que impartieron sus conocimientos en cada una de sus cátedras durante mis años de estudio, a mis padres Patricia Gavilanes y Mario Pilco por su apoyo en todo este proceso formativo.

Agradezco también de manera especial a mi tutor, Dr. **Daniel Argudo Garzón**, por su valiosa guía, paciencia y dedicación a lo largo de este proceso. Su conocimiento y apoyo han sido fundamentales para la culminación exitosa de este trabajo de titulación.

Con un profundo agradecimiento
Danny Pilco

Dedicatoria

A ti, Dios todopoderoso, fuente inagotable de sabiduría, guía y fortaleza, dedico este trabajo de titulación con profunda gratitud y reverencia.

Dedico este trabajo de grado Patricia Gavilanes y Mario Pilco, por su apoyo incondicional en mi etapa estudiantil. Sin su apoyo divino y bendiciones, este logro no habría sido.

Que este trabajo sea un testimonio de tu grandeza y de la fé que nos sostiene.

Con humildad y devoción

Danny Pilco.

Índice

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad	III
Certificación	IV
Agradecimiento	V
Dedicatoria.....	VI
Índice	VII
Resumen	9
Abstract.....	10
1. Introducción	11
2. Fundamento teórico	12
2.1. Definición teórica de los términos claves relacionados a la temática	13
2.1.1. Capacitación Espermática	13
2.1.2. Agentes Crioprotectores	14
2.1.3. Agentes Crioprotectores Permeables (ACP)	14
2.1.4. Agentes Crioprotectores no permeables (ACNP)	14
2.1.5. Conservación Espermática	14
2.1.6. Estrés Oxidativo	15
2.1.7. Coenzima Q 10.....	15
2.1.8. Vitamina K	16
3. Metodología	18
3.1. La zona de estudio	18
3.2. Colecta en Campo y Materiales Utilizados	18
3.2.1. Materiales para la Colecta en Campo:.....	18
3.2.2. Materiales de Laboratorio:	19
3.2.3. Procedimiento de la colecta de semen.....	19
3.3. Evaluación seminal.....	20
3.3.1. Concentración.....	20
3.3.2. Centrifugación	20
3.4. Evaluaciones	20
3.4.1. Eosina Negrosina (Vitalidad y Anormalidades).....	20
3.4.2. Test de host.....	21
3.4.3. Test yoduro de propidio	21
3.4.4. Test de rodamida	22

3.5.	Variables del estudio	22
3.5.1.	Variables independientes del estudio	22
3.5.2.	Variables dependientes.....	22
3.6.	Análisis estadístico	22
3.7.	Descripción del proceso realizado.....	23
3.7.1.	Etapas 1.....	23
3.7.2.	Etapas 2.....	23
3.7.3.	Etapas 3.....	23
4.	Resultados y discusión.....	24
5.	Conclusiones	34
6.	Bibliografía	35
7.	Autorización de publicación en el repositorio institucional	37

Resumen

El semen equino congelado presenta menor viabilidad respecto a otras especies, lo cual se debe principalmente a factores propios del equino o su variabilidad individual por reproductor. Adicionalmente, los machos reproductores son seleccionados por su rendimiento en diversas disciplinas ecuestres y no por su capacidad reproductiva, generando un reto cuando se trata de conservar y potencializar los genes del animal. Este estudio se justifica al estimar que la adición de coenzima Q10 y vitamina K a los espermatozoides congelados tiene un efecto beneficioso sobre su motilidad y otros parámetros de calidad seminal. Para ello, se tuvieron en cuenta variables como motilidad, movilidad, anomalías, funcionalidad de membrana, integridad mitocondrial, y se utilizaron variables independientes como espermatozoides frescos, coenzima Q10 (tratamiento) y vitamina K (tratamiento) en comparación con un grupo control. Los resultados fueron relevantes en cuanto a la motilidad espermática, con $92,20 \pm 1,82$ para el caballo tres. En la concentración espermática, se mostró un punto alto en el equino dos de $115,60 \pm 17,07$, contribuyendo a un total de espermatozoides eyaculados de aproximadamente $1398,19 \times 10^6$. Además, los datos indicaron que no hubo variación significativa en la aplicación de coenzima Q10 y vitamina K respecto a la motilidad y la actividad mitocondrial. Esto llevó a la conclusión de que la adición de coenzima Q10 y vitamina K en el espermatozoides no tiene un efecto significativo en parámetros de calidad como la motilidad y la integridad mitocondrial. Solo en determinadas situaciones, esto podría mejorar la calidad del semen equino mediante criopreservación.

Palabras claves

Equino., semen., congelación., coenzima Q10., vitamina k.

Abstract

Frozen equine semen shows lower viability than other species, mainly due to specific equine factors or individual variability per breeder. Additionally, breeding males are selected for their performance in various equestrian events rather than their reproductive capacity, creating a challenge in preserving and enhancing the animal's genes. This study is justified by estimating that adding coenzyme Q10 and vitamin K to frozen spermatozoa has a beneficial effect on their motility and other seminal quality parameters. For this purpose, variables such as motility, mobility, abnormalities, membrane functionality, and mitochondrial integrity were considered. Independent variables such as fresh sperm, coenzyme Q10 (treatment), and vitamin K (treatment) were used compared to a control group. The results were significant for sperm motility, with 92.20 ± 1.82 for the third horse. Regarding sperm concentration, a peak was shown in equine two with 115.60 ± 17.07 , contributing to a total of approximately 1398.19×10^6 ejaculated sperm. In addition, the data suggested no significant variation in the application of coenzyme Q10 and vitamin K regarding mitochondrial motility and mitochondrial activity. This led to the conclusion that adding coenzyme Q10 and vitamin K to sperm does not significantly effect quality parameters such as motility and mitochondrial integrity. Only in certain situations could this improve the quality of equine semen by cryopreservation.

Keywords

Equine., semen., freezing., coenzyme Q10., vitamin K.

1. Introducción

El tema se centra en la motilidad del espermatozoide de caballo congelado, que es baja en comparación con otras especies. Esto se debe principalmente a factores específicos de los caballos o a diferencias individuales entre cada criador. Además, el criterio de selección de los machos reproductores es su desempeño en diversas pruebas hípicas, más que su desempeño reproductivo, lo que plantea desafíos para la protección y mejora genética de animales de alto valor genético (Acosta et al., 2017).

Por ende, el desarrollo de presión osmótica causado por la exposición a un ambiente altamente osmótico y los cambios en la presión inducidos durante este proceso (Mendoza, 2016). El estrés osmótico se ha asociado con efectos negativos sobre la motilidad, la viabilidad y el potencial de la membrana mitocondrial en el espermatozoide equino (Barry, 2008).

Frente a lo cual, Membrillo et al., (2003) determina que el estrés oxidativo resulta de niveles elevados de especies reactivas de oxígeno debido al choque térmico y la química crioprotectora. Se ha demostrado que los efectos positivos de la coenzima Q10 pueden regular y reducir el estrés oxidativo que se produce en los espermatozoides después de la congelación, lo que puede provocar mutaciones e infertilidad, por lo que el uso de coenzima puede ayudar a mantener la función y mejorar el rendimiento de los espermatozoides, en cuanto a su función y movilidad (Intriago, 2019).

Por otro lado, la suplementación con vitamina K mejora los parámetros de calidad del espermatozoide con niveles de significativa de más del 13% en comparación con la criopreservación (Astrid, 2015). Cabe destacar que, en las últimas décadas, se han logrado avances mínimos en la mejora de la fertilidad del semen equino congelado. Aunque se han llevado a cabo muchas investigaciones en esta área, la integridad del espermatozoide sólo puede protegerse parcialmente contra los distintos tipos de estrés involucrados en el

proceso, a través de la vitamina K que tienen poco efecto sobre el porcentaje de flujo, que es un indicador clave manteniendo la fertilidad potencial (Acosta, 2021).

Se denota que el estrés oxidativo está estrechamente relacionado con el desarrollo de diversos cambios en los espermatozoides criopreservados. Sin embargo, aún existen importantes vacíos en la búsqueda de suplementos o procedimientos que puedan aliviar dicho estrés, la vitamina K y a Q 10 promueve altos niveles de fertilidad potencial a partir del semen equino congelado (Usuga, 2017)

En contexto, durante el proceso de congelación, las mitocondrias producen sustancias con fuerte capacidad oxidativa (llamadas ROS), a medida que disminuye la capacidad de las mitocondrias de los espermatozoides para producir ROS, lo que resulta en un cambio en la actividad mitocondrial (Catalán, 2021).

Por ello, es importante recalcar en este punto que la congelación de esperma puede preservar la fertilidad del caballo utilizando diferentes métodos que permitan que el proceso se desarrolle de manera efectiva. Es necesario congelar las muestras mediante un proceso de calidad para establecer pasos y mecanismos claros que, tras la recogida del esperma, la calidad del mismo no varíe y eliminar posibles riesgos para las generaciones futuras. Por lo tanto, este estudio evalúa principalmente el efecto de la administración de coenzima Q10 y vitamina K sobre la congelación de esperma equino.

2. Fundamento teórico

Para, Lázaro et al (2000) la coenzima Q10 presentan indicios de significancia favorables en la crio preservación, respaldando así lo establecido por John McLeod quien demostró la importancia del estrés oxidativo en su relación con la fertilidad.

Además, Arenas (2001), concuerda con lo establecido por el bioquímico Leonard Merwin y sus colegas al descubrir la ubiquinona, o enzima Q10, mientras estudiaban la enfermedad renal, destacando que la ubiquinona debe su nombre a que es omnipresente

y se encuentra en las mitocondrias de todas las células del cuerpo.

Ahora se sabe que esta sustancia es muy similar a las vitaminas. Es una coenzima liposoluble encargada de transferir electrones para generar energía. Aunque esta coenzima puede sintetizarse en el cuerpo, se pierde a medida que envejecemos (Lenaz, 2000).

Por otro, Fatemah et al., (2017) señala que la vitamina K afecta el desarrollo embrionario in vitro y la crio supervivencia, ya que además de mejorar la reexpansión de los blastocistos, también es beneficiosa para la calidad del embrión ya que actúa la vitamina K como portador de electrones en las mitocondrias embrionarias.

Según Baldoceada et al. (2014), las mitocondrias desempeñan un papel importante a la hora de facilitar el desarrollo temprano de embriones de mamíferos, ya que se ha demostrado que una preparación folicular adecuada aumenta la probabilidad de entrada de embriones generados in vitro. Los niveles de expresión de genes relacionados con la función mitocondrial son mayores en las etapas de blastocisto y embrión (Catalán, 2021).

Por tanto, como hipótesis de investigación, se tiene que la coenzima Q10 y la vitamina K mejoran los parámetros cualitativos y cinéticos del semen equino congelado.

2.1. Definición teórica de los términos claves relacionados a la temática

2.1.1. Capacitación Espermática

El entrenamiento de los espermatozoides es esencialmente una serie de cambios fisiológicos que los mismos experimentan de forma natural. Dado que estos pasan por una etapa de desarrollo y luego fertilizan el óvulo, por ende, estos cambios incluyen el desarrollo de la motilidad y la pérdida de gotitas citoplasmáticas en el espermatozoide que se almacena en la cola del testículo. Por ello, suelen presentar cierta resistencia en los órganos reproductivos antes de que lleguen al óvulo (Hernández, 2013).

2.1.2. Agentes Crioprotectores

Ramónez et al. (2007) los consideran sustancias solubles en agua y de baja toxicidad que pueden bajar el punto eutéctico de la solución en la que se incorporan; por eutéctico se entiende la disminución del punto eutéctico del disolvente a la temperatura más alta que permite la máxima cristalización, lo que hará que los espermatozoides estén más deshidratados, reduciendo así el gradiente osmótico al que están expuestas las células. Los crioprotectores ayudan a mantener la motilidad y la función de los espermatozoides y pueden clasificarse en permeables y no permeables (Lenaz, 2000).

2.1.3. Agentes Crioprotectores Permeables (ACP)

Los agentes crioprotectores permeables son aquellos que tienen un bajo peso molecular y generalmente son incapaces de atravesar membranas, aun cuando son móviles y ayudan a deshidratar las células a bajas temperaturas. Del mismo modo permiten reducir la formación de cristales de hielo intracelulares e incluyen: glicerina, propilenglicol y dimetilsulfóxido (Intriago, 2019).

2.1.4. Agentes Crioprotectores no permeables (ACNP)

Ávila et al. (2006) Se trata de compuestos moleculares de gran tamaño que no pueden atravesar la membrana plasmática y por tanto su efecto protector se manifiesta en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos y pueden deshidratarse rápidamente, reduciendo la formación de cristales y favoreciendo así la supervivencia de los espermatozoides

2.1.5. Conservación Espermática

La técnica de conservación del espermatozoides de caballo en la actualidad emplea tecnología de alta gama que permite la cría de caballos de forma moderna. Estos procedimientos tienen ventajas sobre el espermatozoides fresco: por ejemplo, se puede utilizar tanto para la reproducción como para la mejora genética, es decir, permite la prevención de defectos y deformidades genéticas mediante la extracción de muestras de calidad. Sin embargo, la

congelación de espermatozoides tiene sus limitaciones ya que el recuento de espermatozoides cambia después de la congelación y descongelación (Astrid, 2015).

La inseminación artificial es un método alternativo muy importante de reproducción equina, por lo que la conservación de espermatozoides es una técnica ideal para la obtención de embriones mediante FIV. Sin embargo, los estudios como los de Giraldo et al. (2006), han demostrado que el enfriamiento prolongado del espermatozoide afecta sus propiedades funcionales.

2.1.6. Estrés Oxidativo

Para, Sánchez y Méndez (2013), el aire que se aspira al respirar es oxígeno, esencial para el funcionamiento normal de todas las células. El proceso de pérdida de electrones y absorción o captura de oxígeno se llama oxidación electrones y pierden oxígeno, por lo que cada proceso de oxidación ocurre simultáneamente con otro proceso de reducción, y lo que sucede es que una pequeña porción del oxígeno se convierte en una forma reactiva caracterizada por la reactividad llamada radicales libres.

Las reacciones redox son esenciales para el equilibrio del organismo, porque a través de ellas se obtiene la mayor cantidad de energía, pero Elejalde (2001) señala que, aunque el oxígeno es esencial para la vida, cuando no hay suficientes antioxidantes para hacer frente a los radicales libres, entonces aumento, llamado estrés oxidativo, y por tanto la generación descontrolada de radicales libres puede convertirse en una fuente de enfermedades. Si bien es cierto que todas las células están sujetas a estrés oxidativo, en el caso de los espermatozoides, los niveles adecuados de ROS son importantes para mantener la función normal de los espermatozoides, además de sus funciones con la integridad del ADN nuclear y mitocondrial (Cordova, 2009)

2.1.7. Coenzima Q 10

Lázaro et al., (2000) establece que la Q 10 es un antioxidante liposoluble que se

encuentra en todas las células del cuerpo y se localiza en las mitocondrias, además de participar en la oxidación de los ácidos grasos, también es un componente importante de la respiración.

La coenzima Q10 también se encarga de regular las propiedades físicas y químicas de la membrana plasmática. Una de las principales funciones de esta coenzima, también conocida como ubiquinona, es que interviene en gran medida en la posterior conversión de oxígeno y nutrientes en energía. Los estudios demuestran que la coenzima Q10 juega un papel importante en el transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna, por lo que es esencial para combatir el estrés oxidativo (Arenas, 2001).

Es un lípido redox con función antioxidante. Puede prevenir la peroxidación lipídica al inhibir la formación de hidroperóxidos, mejorar la vitalidad del espermatozoide, el enfriamiento y la baja fertilidad. El intercambio de protones contribuye a la producción de energía. Los beneficios antioxidantes de la CoQ10 se utilizan durante el transporte a través de la membrana mitocondrial durante la congelación, descongelación y centrifugación (Elgueta, 2018).

2.1.8. Vitamina K

Vos et al. (2012) argumentaron que, dado que las mitocondrias son un componente celular importante en el desarrollo embrionario, los medios insuficientes pueden afectar la función mitocondrial, por lo que estamos buscando antioxidantes adicionales para mejorar los diferentes tipos de medios. Aunque las mitocondrias son responsables de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), también son susceptibles al daño de las ROS (Bhalerao & Clandinin, 2012).

Pezham et al (2017) la vitamina K2 actúa como un transportador de electrones en las mitocondrias al afectar las especies reactivas de oxígeno ROS, lo que lleva a una utilización más eficiente del oxígeno y a la producción de ATP

En el ámbito de la reproducción asistida equina, la criopreservación del semen representa un pilar esencial para el avance y la eficiencia de los programas de cría. Sin embargo, los métodos de congelación y descongelación convencionales a menudo comprometen la viabilidad espermática, afectando directamente los resultados de fertilidad. Ante este reto, surge la necesidad de explorar alternativas que mejoren estos procesos. En este contexto, el presente estudio se centra en evaluar la coenzima Q10 y la vitamina K, reconocidas por sus propiedades antioxidantes, como posibles mejoradores de la criopreservación del semen equino. El objetivo principal de esta investigación es determinar cómo la adición de estos compuestos impacta la eficiencia de la congelación del semen.

Este análisis se profundiza a través de varios enfoques específicos: primero, se cuantifica el efecto de estos antioxidantes en los parámetros cualitativos del semen, como la motilidad, la morfología y la viabilidad espermática. Estos indicadores son fundamentales para evaluar la calidad del semen y predecir su comportamiento post-descongelación. Además, se investiga la capacidad de la coenzima Q10 y la vitamina K para preservar la funcionalidad espermática, en particular los parámetros cinéticos, que son cruciales para la motilidad activa necesaria en los procesos de fertilización. Por último, se examina el impacto protector de estos nutrientes sobre las mitocondrias de los espermatozoides, estructuras clave que sustentan la producción de energía y la supervivencia celular durante la criopreservación.

3. Metodología

3.1.La zona de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, localizado específicamente en Cuenca, dentro de la provincia de Azuay, Ecuador, a lo largo de la Panamericana Norte Km 2½. (Maps, 2017).



3.2.Colecta en Campo y Materiales Utilizados

3.2.1. Materiales para la Colecta en Campo:

- Caballo Entero
- Vagina Artificial (Funda de vagina)
- Calentador de Agua
- Filtros
- Agua ultrapura
- Tubos de 50 ml
- Venda elástica
- Termómetro
- Recipiente graduado
- Vasos de precipitación

- Papel Aluminio

3.2.2. Materiales de Laboratorio:

- Microscopio
- Placa térmica
- Pipetas
- Tubos Eppendorf
- Pajuelas
- Porta y cubreobjetos
- Tubos de 15 ml
- Microscopio de Fluorescencia
- Yema de huevo
- Jeringas de 3 – 10 ml
- Tinciones: Eosina Negrosina, Host, Yoduro de Propidio, Rodamida

3.2.3. Procedimiento de la colecta de semen

Preparación de la Vagina Artificial (V.A): Dentro de la V.A se introdujo una camisa la cual se calentó con agua tibia a unos 56°C, pero para ajustar la temperatura más propicia se colocó agua fría hasta llegar a 46°C V.A.

Posteriormente se procedió a la asepsia del caballo, donde se lavó el pene con suero fisiológico a 37°C y se secó con una toalla.

En la yegua se usó pilares para evitar golpear al reproductor, luego se ató la cola hacia adelante para evitar la penetración. Una vez recogido el esperma, se colocó en un vaso de precipitación.

Posterior a ello se midió el esperma mL y se diluyó en proporción 1:1, con diluyente de transporte a 37 °C y se pasó a los tubos de 50 ml estériles los mismos fueron transportados al laboratorio.

3.3.Evaluación seminal

Para la evaluación seminal, primero, se enciende la placa térmica ajustándola a una temperatura de entre 35 y 37 °C. Una vez precalentada, se colocan los portaobjetos y cubreobjetos sobre ella. A continuación, se depositan 10 microlitros de la muestra de semen entre la porta y el cubreobjetos para proceder inmediatamente a la evaluación de la motilidad individual o progresiva de los espermatozoides. Se examinan entre tres y cinco campos diferentes en la misma placa, seleccionando el campo que ofrezca la mejor visibilidad y detallando la motilidad observada en los espermatozoides.

3.3.1. Concentración

Para determinar la concentración espermática, se tomó un tubo eppendorf al que se añadieron 95 microlitros de agua y 5 microlitros de semen, se homogenizó la mezcla antes de introducirla en la cámara de Neubauer. Con precisión, depositamos 10 microlitros de esta mezcla diluida en cada lado de la cámara. Utilizando las cuatro esquinas y una cuadrícula central de la cámara, procedimos al conteo de espermatozoides para calcular tanto el número promedio en la muestra original como en la muestra diluida.

3.3.2. Centrifugación

Para la centrifugación, se tomaron 10 ml de semen en cada tubo de ensayo y se colocaron en la centrífuga, ajustando la velocidad a 800 gravedades durante 10 minutos. Tras este proceso, se recogió el pellet de semen y se procedió a realizar un nuevo conteo en la cámara de Neubauer, con el fin de ajustar correctamente la cantidad de diluyente CRIO RAMP 100 ® necesaria.

3.4.Evaluaciones

3.4.1. Eosina Negrosina (Vitalidad y Anormalidades)

Para la tinción de Eosina-Nigrosina (EN) que permite evaluar la vitalidad y la presencia de anomalías en los espermatozoides, se depositó una gota compuesta por 15 microlitros de semen y 5 microlitros de tinción EN en un portaobjetos. Tras mezclar

cuidadosamente, se extendió la mezcla formando un frotis. Una vez seco, el frotis se examinó bajo un microscopio utilizando un objetivo de 40x. Los espermatozoides teñidos de rojo se identificaron como muertos, mientras que aquellos que no absorbieron la tinción se consideraron vivos. Durante el análisis, se contabilizaron al menos 100 espermatozoides por placa para determinar la proporción de espermatozoides vivos, muertos y con anomalías.

3.4.2. Test de host

Para realizar el test de HOST (Prueba Hiposmótica), se colocaron 50 microlitros de solución Hiposmótica y 15 microlitros de semen en un tubo eppendorf. Esta mezcla se dejó reposar sobre una placa térmica a temperatura controlada durante 20 minutos. Finalizado este periodo, se extrajeron 10 microlitros de la mezcla y se colocaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos para su observación bajo un microscopio con objetivo de 40x. Se enfocó en identificar aquellos espermatozoides que presentaban la cola enrollada, indicativo de una reacción positiva al test. Se contaron tanto los espermatozoides que respondieron positivamente como el total observado, contabilizando al menos 100 espermatozoides por placa para obtener una muestra representativa.

3.4.3. Test yoduro de propidio

Para realizar el test de yoduro de propidio, primero utilizamos un microscopio de fluorescencia marca Olympus vx51 del país de origen Japón y con un filtro de longitud de onda de 405 nm. Se preparó un tubo eppendorf en el que mezclamos 50 microlitros de semen con 5 microlitros de yoduro de propidio. Esta mezcla se colocó sobre la placa térmica durante 5 minutos. Posteriormente, aplicamos 10 microlitros de esta muestra entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Bajo observación con el microscopio de fluorescencia, identificamos los espermatozoides cuyas cabezas se teñían de rojo, indicando que estaban

mueritos, mientras que aquellos que no absorbían el tinte se consideraban espermatozoides vivos.

3.4.4. Test de rodamida

Para el test de Rodamina, se utilizaron 50 microlitros de semen mezclados con 2 microlitros de Rodamina en un tubo eppendorf, el cual se incubó durante 10 minutos sobre una placa térmica. Después de la incubación, se colocaron 10 microlitros de la mezcla entre una porta y un cubreobjetos para proceder al análisis bajo un microscopio de fluorescencia. En la observación, se denoto que los espermatozoides que tenían actividad mitocondrial se teñían de color verde y los que no, permanecieron sin teñirse.

3.5. Variables del estudio

3.5.1. Variables independientes del estudio

- Semen fresco
- Coenzima Q10 (Tratamiento)
- Vitamina K (Tratamiento)
- Control

3.5.2. Variables dependientes

- Motilidad
- Vitalidad
- Anormalidades
- Integridad de la membrana
- Funcionalidad de la membrana
- Integridad mitocondrial

3.6. Análisis estadístico

Las variables de tratamiento se compararon mediante análisis de varianza (ADEVA) al nivel de significancia del 5%. La media y la desviación estándar se utilizaron para

mostrar los resultados. Todas las pruebas estadísticas se desarrollaron en el paquete estadístico SPSS versión 23 a través del cual se efectuó una descripción de todo el proceso realizado.

3.7.Descripción del proceso realizado

3.7.1. Etapa 1

Primero se seleccionaron los sementales, para la recolección de semen se utilizaron cuatro caballos. Se utilizó un microtubo como vagina artificial a través de un filtro de malla de nylon incorporado para obtener muestras de esperma. Luego se separó una porción del gel de esperma recogido de la yegua.

3.7.2. Etapa 2

Para este paso se diluyeron los espermatozoides sin gel 1:1 (v:v) con diluyente CRIO RAMP 100 y se precalentaron a 37 °C. Se colocaron muestras de diez microlitros en placas calientes, cubreobjetos y portaobjetos de vidrio para evaluar la motilidad individual progresiva. Observa de 3 a 5 campos y marca mejor cada muestra.

3.7.3. Etapa 3

A fin de centrifugar y enviar al laboratorio para su procesamiento y análisis destinado a evaluar parámetros cinéticos y cualitativos. Esto a través del disolvente CRIO RAMP 100. En este punto se agregó 25 micromoles de coenzima Q10 y 25 micromoles vitamina K al semen congelado. Después de agregar estos componentes se analizó la calidad y las propiedades funcionales del esperma refrigerado y congelado 24 horas después para comprobar el estado y funcional de los espermatozoides, incluidos parámetros como la motilidad.

4. Resultados y discusión

En la Tabla 1 presenta un análisis detallado de tres parámetros del semen puro: motilidad, volumen y concentración espermática, basado en la evaluación de cuatro ejemplares. Este análisis revela que, en promedio, la motilidad espermática se situó en $92,20 \pm 1,82$. Indicando una variabilidad en la capacidad de movimiento de los espermatozoides entre los ejemplares estudiados. El volumen de semen, por otro lado, se mantuvo relativamente en el equino número dos, con un promedio de $121,00 \pm 4,74$ demostrando la variabilidad reflejada en la cantidad de semen producido por cada ejemplar.

Tabla 1. Valores de volumen, motilidad y concentración espermática de la especie, en la muestra de semen puro. Los datos muestran la media \pm la desviación estándar.

Caballo	N	Volumen (mL)	Motilidad (%)	Concentración (X10 ⁶ /mL)	Total, de espermatozoides (X10 ⁶ /eyaculado)
1	5	50,00 \pm	90,00 \pm	105,40 \pm 17,07	5270,00 \pm
		4,74 ^b	1,82		1398,19 ^b
2	5	121,00 \pm	86,60 \pm	115,60 \pm 17,07	14007,00 \pm
		4,74 ^a	1,82		1398,19 ^a
3	5	69,00 \pm	92,20 \pm	88,20 \pm 17,07	6134,00 \pm
		4,74 ^{b, c}	1,82		1398,19 ^b
4	5	84,00 \pm	84,20 \pm	105,20 \pm 17,07	8861,00 \pm
		4,74 ^c	1,82		1398,19 ^{a, b}

N= número de colectas. Letras distintas en la misma columna muestran diferencias estadísticas significativas.

Es interesante contrastar estos hallazgos con los reportados por Duque et al. (2017), quienes examinaron el impacto de diferentes aditivos en la criotolerancia del semen

equino. En su estudio, encontraron que la adición de fosfatos y carbonatos mejoraba significativamente la motilidad espermática post-descongelación, así como la integridad de la membrana plasmática, con valores de la enzima catalasa notablemente elevados. Estos resultados destacan la importancia de los aditivos antioxidantes en la preservación de la calidad seminal durante la congelación y descongelación. Al comparar estos efectos con los observados en el caso de estudio, donde la Coenzima Q10 y la Vitamina K se utilizaron como aditivos, se observa una tendencia similar en la mejora de la motilidad espermática.

La mejora en la motilidad espermática observada con el uso de fosfatos y carbonatos sugiere que estos componentes podrían ser especialmente efectivos para neutralizar los efectos dañinos de los procesos de congelación y descongelación sobre los espermatozoides, esto se debe a que los mismos contienen moléculas de oxígeno y sustancias nutritivas que requieren los espermatozoides para garantizar su calidad. Similarmente, la Coenzima Q10 y la Vitamina K podrían proporcionar beneficios adicionales relacionados con la mejora de la energía celular y la protección antioxidante, respectivamente (Usuga, 2017). Estos hallazgos sugieren un área potencial para futuras investigaciones donde la combinación de estos aditivos podría ser explorada para maximizar la viabilidad y la calidad espermática en programas de criopreservación equina.

En la investigación de Castro y Chacón (2016), se destaca que la elección de crioprotectores como MFM o DMF mejora significativamente la motilidad progresiva y la viabilidad del semen equino después de la descongelación, indicando que el uso de Dimetilformamida DMF al 3.5% aumenta la motilidad progresiva a 69.00 ± 3.61 y la viabilidad a 34.00 ± 3.46 . Esto sugiere que estos crioprotectores son eficaces en mitigar los daños causados por los procesos de congelación y descongelación bajo condiciones

ambientales controladas, esto se debe a que los crioprotectores poseen un alto peso molecular que permiten altas temperaturas frente a la congelación o criopreservación, promoviendo una rápida acción protectora a nivel celular. Comparativamente, el estudio presentado evalúa el impacto de aditivos como la Coenzima Q10 y la Vitamina K, enfocándose en cómo estos antioxidantes pueden influir en la resistencia del semen al estrés oxidativo durante la criopreservación, demostrando que ambos tipos de aditivos tienen roles complementarios en la preservación de la calidad seminal.

La concentración espermática mostró un punto alto en el equino dos de $115,60 \pm 17,07$, lo que contribuyó a un total de espermatozoides eyaculados de aproximadamente $1398,19 \times 10^6$. Esta medida refleja la densidad de espermatozoides en el semen y, junto con el volumen, determina el total de espermatozoides disponibles por eyaculación. La variabilidad entre los ejemplares, indicada por las notaciones a, b en la tabla 1, sugiere diferencias significativas en la fertilidad potencial, lo que podría tener implicaciones para la selección de reproductores basada en criterios de calidad seminal.

La evaluación avanzada de las subpoblaciones de espermatozoides es fundamental para identificar variaciones significativas en la calidad espermática, que influyen directamente en la fertilidad potencial. El estudio de Restrepo et al., (2014) resalta la importancia de incorporar tecnologías como el análisis de semen asistido por computadora, para una medición más objetiva y detallada de parámetros espermáticos críticos. Estas tecnologías permiten no solo identificar diferentes subpoblaciones espermáticas, sino también evaluar su funcionalidad y capacidad fecundante de manera más precisa. Tal enfoque es crucial para la selección adecuada de sementales en programas de reproducción asistida, asegurando la utilización de espermatozoides con las mejores características fecundantes y, por ende, potenciando la eficiencia de las técnicas de criopreservación y manejo reproductivo.

Para Restrepo et al. (2023), a través de un análisis efectuado mediante caballos criollos se determinaron las asociaciones entre variables. Las puntuaciones medias generales de movilidad fueron $54,3 \pm 10,1$ y $61,8 \pm 13,9$ para la evaluación convencional y el sistema SCA®, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los métodos analíticos. Por ende, el autor concluye que el análisis de esperma equino utilizando métodos convencionales y el sistema SCA® es comparable al análisis de fluidez del semen equino criopreservado.

Los resultados específicos para cada caballo muestran variaciones interesantes:

El Caballo 1 tuvo la menor concentración espermática pero la motilidad más alta, indicando espermatozoides muy activos, aunque en menor cantidad.

El Caballo 2 presentó el volumen más alto y la segunda motilidad más alta, sugiriendo un balance favorable entre cantidad y calidad del semen.

El Caballo 3 mostró valores medios en todas las categorías, representando un caso intermedio.

El Caballo 4, con un volumen y motilidad ligeramente por debajo de la media, aun así, mantuvo una concentración espermática saludable.

Los resultados obtenidos en el caso de estudio sobre la mejora de la motilidad espermática mediante el uso de Coenzima Q10 y Vitamina K pueden compararse con los hallazgos de Wilde et al. (2004), quienes investigaron los efectos del lactato de sodio y la cafeína en semen equino. Al igual que en nuestro estudio, Wilde et al. (2004) encontraron mejoras significativas en la motilidad espermática al agregar aditivos antioxidantes al diluyente, destacando la efectividad de estas sustancias para conservar la funcionalidad espermática durante la refrigeración. Sin embargo, en este estudio no se encontró mejoría. A diferencia de nuestro enfoque con antioxidantes específicos para combatir el estrés oxidativo durante la congelación, Wilde y su equipo utilizaron aditivos como lactato y

cafeína, que interactúan directamente con la bioquímica espermática para potenciar la motilidad, demostrando así diferentes estrategias para optimizar la calidad seminal. En términos metodológicos, el estudio de Wilde para investigar el efecto de la adición de cafeína y lactato sobre la motilidad del semen equino diluido en leche descremada-glucosa implementó un enfoque interesante al incorporar aditivos tanto al inicio de la dilución como después de 48 horas de almacenamiento, evaluando su efecto en diferentes puntos temporales. Este enfoque permite entender mejor la dinámica temporal de la actividad espermática en respuesta a los aditivos. En contraste, el caso de estudio se centró en la evaluación de la motilidad post-descongelación inmediata, proporcionando una perspectiva sobre la efectividad de la Coenzima Q10 y la Vitamina K en mitigar los efectos inmediatos del estrés de congelación y descongelación. Ambos estudios, aunque difieren en sus detalles experimentales y aditivos específicos, subrayan la importancia de seleccionar cuidadosamente los componentes del diluyente para maximizar la viabilidad y funcionalidad espermática.

Lo anterior es corroborado por Agüero (2022) en base a la evaluación de los patrones de motilidad, este autor determinó que la distribución de subpoblaciones de espermatozoides en semen fresco en el 90% de la motilidad de los espermatozoides evaluados, de los cuales el 10% presentó un movimiento lineal progresivo, distribuido por velocidad como: espermatozoides de movimiento rápido correspondiente al 18% estimado de la muestra total, en promedio espermatozoides móviles a un 40%, espermatozoides de movimiento lento con 32% de la muestra total y espermatozoides estáticos a un nivel del 10% de la muestra total.

Según, Castro y Chacon (2016), la congelación de espermatozoides permite la preservación y almacenamiento del material genético a largo plazo. La inseminación artificial con espermatozoides congelados es una herramienta importante para utilizar sementales con excelente

genética, baja motilidad eyaculatoria y alta proporción de espermatozoides anormales. Además, existe variación en la calidad de la eyaculación entre individuos; sólo un pequeño porcentaje de sementales responde bien a la congelación.

La tabla uno ofrece una visión detallada de los resultados obtenidos a partir de la evaluación de semen fresco en tres diferentes tratamientos, cada uno aplicado a un conjunto de 20 muestras. Se analizaron diversos parámetros esenciales para la calidad seminal, incluyendo la motilidad, la vitalidad, las anormalidades espermáticas, la funcionalidad y la integridad de la membrana, así como la actividad mitocondrial. Estos indicadores son cruciales para determinar la viabilidad y el potencial fecundante del semen.

La motilidad refleja la vitalidad espermática que posee el equino que a veces se ve influenciada por la raza del mismo. Para Castro y Bastres (2018) establece que, a modo general, sólo el 20-30% de los sementales producen esperma con buena capacidad de congelación, hay razas donde el valor es superior entre 40-60% con capacidades aceptables. Estas limitaciones hacen que la inseminación artificial de esperma congelado sea menos común en caballos que en otras especies, y encontrar sistemas y procedimientos de enfriamiento o congelación adecuados sea convertido en uno de los principales objetivos de los estudiosos.

Cabe destacar que, los resultados muestran una notable consistencia en la motilidad espermática entre los tratamientos, con un promedio uniforme de $87,75 \pm 0,77$. Este alto nivel de uniformidad en la motilidad sugiere que los diferentes tratamientos aplicados mantienen eficazmente la capacidad de movimiento activo de los espermatozoides, un factor clave para el éxito de la fertilización.

En cuanto a la vitalidad, se observaron ligeras variaciones numéricas entre los tratamientos: la vitamina K presentó una vitalidad promedio de $62,48 \pm 1,86$, mientras

que la Q10 mostró un promedio ligeramente menor de $59,11 \pm 1,86$, y el control volvió a mostrar una vitalidad similar a la vitamina K con $62,09 \pm 1,86$. Estas diferencias fueron únicamente numéricas y no estadísticamente significativas, sugiriendo que ciertos tratamientos pueden tener un impacto leve pero no discernible en la capacidad de los espermatozoides para mantenerse vivos y activos. La frecuencia de anormalidades espermáticas también varió numéricamente entre los tratamientos, siendo más baja para el Q10 ($3,73 \pm 0,84$) y más alta en el control ($6,33 \pm 0,84$). Estas diferencias fueron únicamente numéricas y no estadísticamente significativas, indicando que algunos tratamientos pueden estar asociados con una mayor incidencia de formas espermáticas irregulares, lo cual podría influir negativamente en la eficiencia reproductiva.

Respecto a la funcionalidad de la membrana, se notaron diferencias numéricas entre los tratamientos, destacando una mejor preservación de la integridad de la membrana en la vitamina K ($71,18 \pm 2,77$) comparado con el control ($63,14 \pm 2,77$). La actividad mitocondrial, esencial para el soporte energético de los espermatozoides, mostró la mayor media en el control ($45,19 \pm 1,52$), sugiriendo una optimización de la capacidad energética en este grupo. Estas diferencias fueron únicamente numéricas y no estadísticamente significativas.

Del mismo modo, se puede acotar que, en cuanto a la función e integridad de las membranas, así como a la actividad mitocondrial, los valores también disminuyeron tras la congelación y descongelación. Esto es muy importante porque muestra que la congelación puede afectar la salud de los espermatozoides a nivel celular, alterando potencialmente la capacidad de los espermatozoides para fertilizar eficazmente. Por otro lado, sorprende que, aunque la motilidad se mantiene preservada, otros factores importantes para la salud del esperma muestran una ligera disminución (Acosta, 2021).

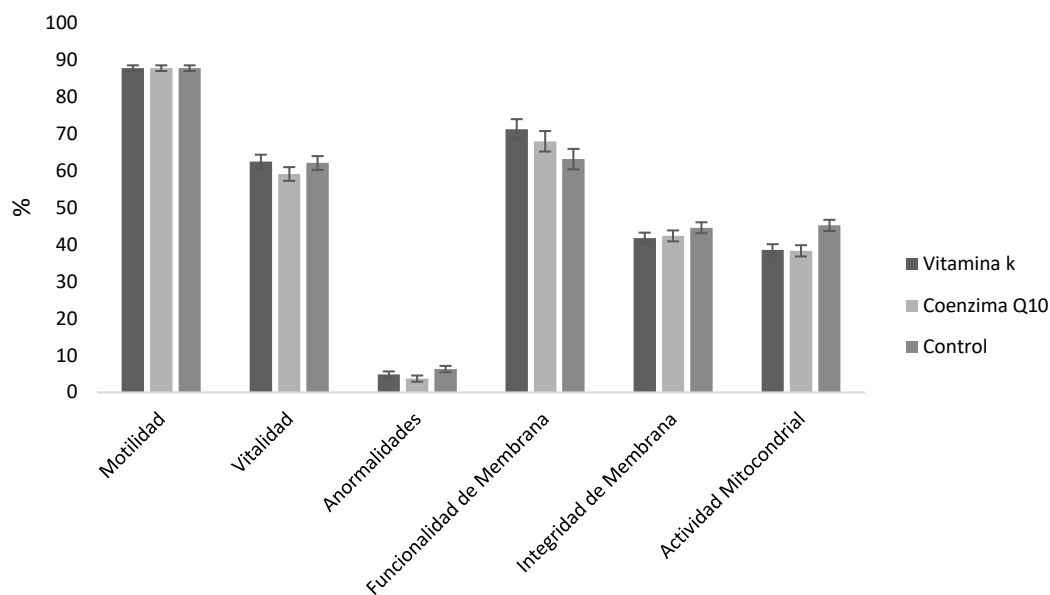


Figura 1. Valores de motilidad, vitalidad, anormalidades, funcionamiento, integridad y actividad mitocondrial, en la muestra espermática fresca de la especie. Los datos muestran la media \pm la desviación estándar.

Específicamente, en este punto a través de la imagen uno, se denota que no persiste diferencia significativa en la actividad mitocondrial entre los tratamientos, un aspecto crítico para la evaluación de la calidad seminal. Aun cuando se aprecia cómo el control presenta un incremento notable en la actividad mitocondrial ($45,19 \pm 1,52$), en comparación con la vitamina K y la Q10, donde los valores fueron menores.

La figura 2 se muestra cómo se comportan distintos parámetros del semen después de ser congelado y descongelado, usando tres tratamientos diferentes. Se puede observar que, en general, la motilidad del semen se mantiene bastante estable en todos los tratamientos con un promedio de $87,34 \pm 0,39$. Esto indica que la congelación y descongelación no afectan de manera significativa la capacidad de movimiento de los espermatozoides.

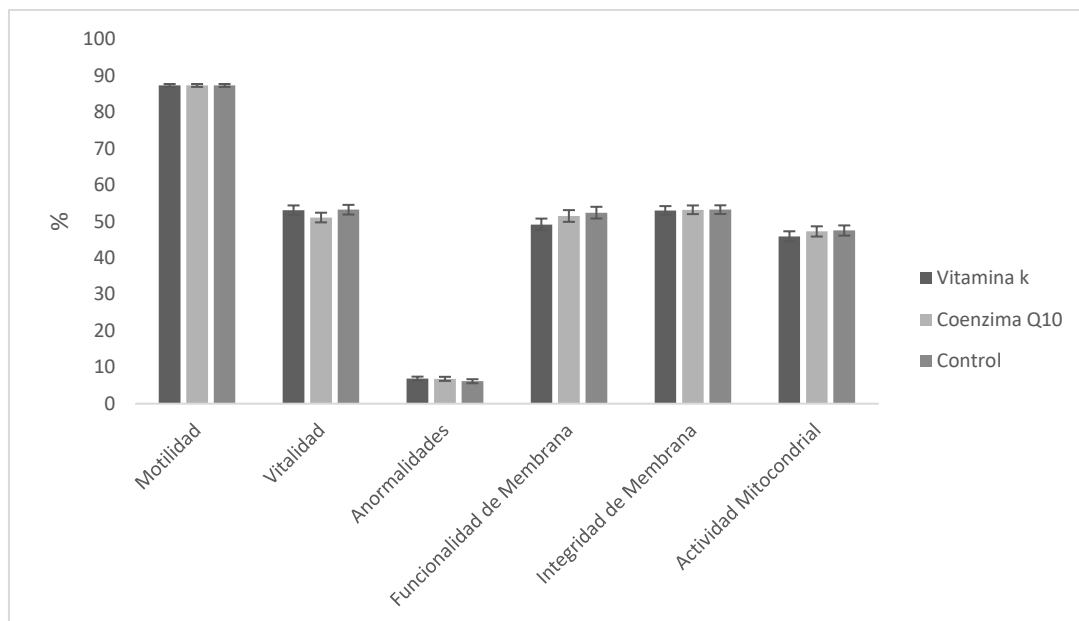


Figura 2. Valores de motilidad, vitalidad, anormalidades, funcionamiento, integridad y actividad mitocondrial, en la muestra congelada y descongelada. Los datos muestran la media \pm la desviación estándar.

En la figura 3 se muestra cómo los tratamientos (vitamina k, coenzima Q10, control) influyen en el semen durante los procesos de congelación y descongelación, atribuyendo valores positivos en la motilidad, vitalidad, funcionalidad, actividad de la membrana mitocondrial, pero en ninguna de los tratamientos existe diferencia significativa. También se muestra una carga baja de anormalidades entre los espermatozoides, más no existe diferencia entre tratamientos.

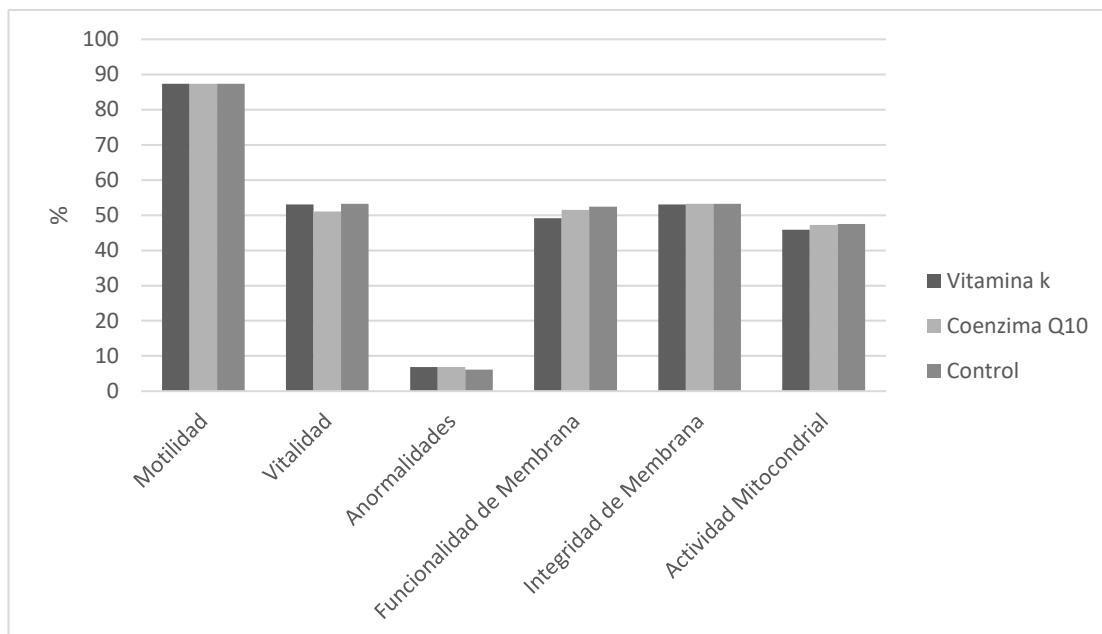


Figura 3. *Determinación de los valores de motilidad, vitalidad, anormalidades, funcionamiento, integridad y actividad mitocondrial, en la muestra espermática congelada y descongelada.*

Los resultados obtenidos indican que no hubo variación significativa en la aplicación de coenzima Q10 y vitamina K frente a la motilidad y la actividad mitocondrial del semen congelado, lo que concuerda con investigaciones previas, pues, aunque no hubo diferencia entre tratamientos se afirma que la CoQ10 es buena para el estrés oxidativo. Para ello los estudios de los autores Membrilo et al. (2003) y Nadjarzadeh et al. (2013), establecieron en su indagación en estudios separados con sementales que a modo particular observaron que no persistía ninguna variación en la motilidad espermática promedio del semen fresco ($87,75 \pm 0,77$).

Es importante reconocer las limitaciones del presente estudio, como el número de sementales evaluados y la concentración fija de los aditivos utilizados. Investigaciones futuras deberían enfocarse en explorar un rango más amplio de dosificaciones y en evaluar su efecto en una variedad más diversa de parámetros espermáticos, como la integridad del ADN y la capacidad de fecundación.

5. Conclusiones

La incorporación de coenzima Q10 y vitamina K en la congelación de semen equino fue evaluada para determinar su influencia en la calidad del esperma, midiendo parámetros como la motilidad, la vitalidad, las anomalías espermáticas y la actividad mitocondrial. Los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas, indicando que la adición de estas sustancias no mejora significativamente los parámetros evaluados. Esto sugiere que, a pesar de sus conocidas propiedades antioxidantes y energéticas, el efecto de la coenzima Q10 y la vitamina K en la preservación de la calidad del semen congelado puede ser limitado.

La coenzima Q10 y vitamina K no refleja diferencias estadísticas significativas sobre variables como la vitalidad, la motilidad, la actividad mitocondrial y la motilidad de los espermatozoides

Se evidenció una distinción visual en la actividad mitocondrial que subraya la importancia de este parámetro como indicador del potencial energético de los espermatozoides, crucial para su movilidad y viabilidad. El análisis del uso de vitamina K y Q10 como potenciadores del esperma sugiere que, aunque ambos aditivos presentan beneficios, la vitamina K parece ofrecer una mejor conservación del esperma.

6. Bibliografía

- Acosta, M. (2021). *Evaluación de la integridad y funcionalidad espermática post descongelación del caballo criollo colombiano*. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80273/78753206.2021.pdf?sequence=8&isAllowed=y>
- Acosta, M. (2021). *Evaluación de la integridad y funcionalidad espermática postdescongelación del caballo criollo colombiano mediante el uso de antioxidantes y un inhibidor de la capacitación*. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80273/78753206.2021.pdf?sequence=8&isAllowed=y>
- Agüero, G. (2022). *Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)*. http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf
- Arenas, J. (2001). *El envejecimiento cutáneo y la coenzima Q10* (Vol. 20).
- Astrid, P. (2015). *Determinación de la viabilidad espermática post, descongelamiento, bajo efecto de la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano (Tesis de Grado)*. Uniuersidad de la Salle. https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicin_a_veterinaria
- Barry, B. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*, 107(3), 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Bhalerao, S., & Clandinin, T. (2012). Cell biology. Vitamin K2 takes charge. *Comment Science*, 336(8). <https://doi.org/10.1126/science.1223812>
- Catalán, J. (2021). *Efectos de la fotoestimulación en el semen de burro y caballo (Tesis Doctoral)*. Universidad Autónoma de Barcelona, Ballaterra. https://www.researchgate.net/profile/Jaime-Catalan-2/publication/365354598_EFECTOS_DE_LA_FOTOESTIMULACION_EN_EL_SEMEN_DE_BURRO_Y_CABALLO/links/6372419d54eb5f547cd135c3/EFECTOS-DE-LA-FOTOESTIMULACION-EN-EL-SEMEN-DE-BURRO-Y-CABALLO.pdf
- Cordova, A. e. (2009). ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1). https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53689644/23620-23639-1-PB-libre.pdf?1498655577=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEstres_oxidativo_y_antioxidantes_en_la_c.pdf&Expires=1682056681&Signature=Pzl~MFJUiQuaf0fWiVw0iuY2qMrPTx-GSUAQDWj8hU~J~
- Elejalde, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna*, 18(6). https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010

- Giraldo, N., Correa, J., & Vasquez, N. (2006). Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista Ces Medicina veterinaria y zootecnia*, 2(2). <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428499001.pdf>
- INEC, I. N. (2019). *Canton Cuenca*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Fasciculos_Censales/Fasc_Cantonales/Azuay/Fasciculo_Cuenca.pdf
- Intriago, J. (2019). *EFEECTO DE LA COENZIMA Q10 COMO ANTIOXIDANTE SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DEL SEMEN FRESCO*. <https://repositorio.espm.edu.ec/bitstream/42000/1147/1/TTMV4.pdf>
- Lenaz, G. (2000). *Una visión general del papel de la coenzima Q en la fosforilación oxidativa mitocondrial*. Italy .
- Maps, G. (2017). *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Cuenca*. <https://www.google.com/maps/d/viewer?ie=UTF8&t=h&source=embed&oe=UTF8&msa=0&mid=1Qe4eXbwr-kQH4-BZSb61X1Axf-g&ll=-2.9201300000000145%2C-79.0250444&z=17>
- Mendoza, L. F. (2016). *Evaluación de inductores de la capacitación espermática en semen criopreservado de asnos (equus asinus)*. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83291/Tesis%20Burros%20Luis%20Mendoza%20Arenas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Paredes, A. (2017). *Determinación de la viabilidad espermática postdescongelamiento, bajo efecto de la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano*. https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicina_veterinaria
- Sánchez, V., & Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista investiga Med Sur*, 20(3), 161-168. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms133e.pdf>
- Solis, A. (2022). *Evaluación de dos protocolos de criopreservación de semen equino*. https://up-rid.up.ac.pa/6831/1/felix_contreras.pdf
- Usuga Suárez, A. (2017). *Factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en el caballo criollo colombiano y su relación con la calidad de semen criopreservado*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Medellín, Colombia.: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59822>



AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Danny Javier Pilco Gavilanes, portador de la cédula de ciudadanía N° 0606175586. En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Evaluación de la Coenzima Q10 y la Vitamina K en la congelación de semen equino”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **03 de julio de 2024**

Danny Javier Pilco Gavilanes
C.I. .0606175586