



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 VITAMINA K Y COENZIMA Q10 EN LA  
REFRIGERACIÓN DE SEMEN EQUINO**

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

**AUTOR: JUAN CARLOS CABRERA SALDAÑA**

**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 VITAMINA K Y COENZIMA Q10 EN  
LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN EQUINO**

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

**AUTOR: JUAN CARLOS CABRERA SALDAÑA**

**DIRECTOR: Dr. DANIEL ARGUDO, PhD.**

**CUENCA – ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESAROLLO**

### **Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Juan Carlos Cabrera Saldaña** portador de la cédula de ciudadanía N° 0105709489. Declaro ser autor de la obra: **“Evaluación de la Vitamina K y Coenzima Q10 en la refrigeración 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, **12 de Julio de 2024**



---

Juan Carlos Cabrera Saldaña  
0105709489

## 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 Vitamina K y Coenzima Q10 en la refrigeración de semen equino”**, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por **Juan Carlos Cabrera Saldaña**, bajo mi supervisión.



Firmado electrónicamente por:  
DANIEL ERNESTO  
ARGUDO GARZON

**MVZ. Daniel Argudo, Garzón, PhD.**  
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**DOCENTE DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

## **Agradecimiento**

En primer lugar, agradezco Dios, a mi familia y a mi director de tesis, Dr. Daniel Argudo, por su orientación en este proyecto, su paciencia y apoyo constante durante todo el proceso de investigación.

Agradezco también a los profesores por impartir su conocimiento , por sus comentarios constructivos y su disposición para ayudar a mejorar esta investigación.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo investigativo a mis padres, por su amor incondicional y apoyo constante a lo largo de este viaje académico. Sin su paciencia, comprensión y aliento, este logro no hubiera sido posible.

A toda mi familia, cuya compañía y apoyo han sido una fuente inagotable de inspiración y motivación.

## Índice

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad .....	III
Certificación.....	IV
Agradecimiento .....	V
Dedicatoria .....	VI
Índice.....	VII
Resumen.....	8
Abstract .....	9
1. Introducción .....	10
2. Fundamento teórico.....	11
2.1. Definición teórica de los términos claves relacionados a la temática .....	11
3. Metodología .....	15
3.1. La zona de estudio.....	15
3.2. Diseño experimental.....	15
3.3. Descripción del proceso realizado.....	15
3.3.1. Etapa 1.....	15
3.3.2. Etapa 2.....	16
3.3.3. Etapa 3.....	16
3.4. Alcance y los objetivos del estudio .....	16
3.5. Criterios de inclusión y exclusión .....	17
3.6. Unidades experimentales.....	17
3.7. Variables independientes.....	17
3.8. Variables dependientes.....	17
3.9. Materiales para la Colecta en Campo:.....	17
3.10. Materiales de Laboratorio: .....	17
3.11. Procedimiento de la colecta de semen.....	17
3.12. Evaluación seminal .....	18
3.13. Concentración .....	18
3.14. Centrifugación.....	18
3.15. Tinciones .....	18
3.16. TEST DE HOST .....	19
3.17. TEST YODURO DE PROPIDIO .....	19
3.18. TEST DE RODAMIDA .....	19
4. Resultados y discusión.....	20
5. Conclusiones .....	25
6. Bibliografía .....	26
7. Autorización de publicación en el repositorio institucional .....	29

## Resumen

Este estudio resalta como la vitamina K y la coenzima Q10 pueden influir en la calidad del esperma criopreservado de caballos, cuya viabilidad suele ser menor en comparación con otras especies, limitando así los avances en biotecnología reproductiva. Principio del formulario. Por ende, la justificación de este estudio parte de la necesidad de superar las limitaciones de la fertilidad equina. Para evaluar el semen equino las variables dependientes incluyeron motilidad, y anomalías de los espermatozoides, mientras que las variables independientes fueron la presencia de vitamina K, coenzima Q10 y un grupo de control sin estos suplementos. La viabilidad de la vitamina K (T2) tuvo una media ligeramente mayor de  $60,38 \pm 2,08$ . Dentro de la funcionalidad de la membrana, hubo diferencias entre tratamientos, destacando que el T2 ( $83,04 + 11,03$ ) a comparación con el T1 y T3. Por otro lado, después de 48 horas de refrigeración, se observa una disminución consistente en los valores del esperma en comparación con las primeras 24 horas. Se lograron notar variaciones en la actividad mitocondrial entre los tratamientos, lo que indica un deterioro en la calidad del esperma. Los resultados indican que el esperma se puede refrigerar por 24 horas sin cambios significativos, pero no se recomienda almacenamiento prolongado.

**Palabras claves:** *Fertilidad, Coenzima Q10, Vitamina K, Semen*

**Abstract**

This study highlights how vitamin K and coenzyme Q10 may influence the quality of cryopreserved sperm in horses, whose viability tends to be lower compared to other species, thereby limiting advancements in reproductive biotechnology. Beginning of the form. Therefore, the justification for this study stems from the need to overcome the limitations of equine fertility. To assess equine semen, the dependent variables included motility and sperm abnormalities, while the independent variables were the presence of vitamin K, coenzyme Q10, and a control group without these supplements. The viability of vitamin K (T2) had a slightly higher mean of  $60.38 \pm 2.08$ . Regarding membrane functionality, there were differences between treatments, with T2 ( $83.04 + 11.03$ ) standing out compared to T1 and T3. On the other hand, after 48 hours of freezing, there is a consistent decrease in sperm values compared to the first 24 hours. Variations in mitochondrial activity were observed between the treatments, indicating a deterioration in sperm quality. The results indicate that sperm can be frozen for 24 hours without significant changes, but extended storage is not recommended.

**Keywords:** *Fertility, Coenzyme Q10, Vitamin K, Semen*

## 1. Introducción

La problemática a solucionar va enfocada a la baja fertilidad del esperma equino criopreservado que limita los procedimientos biotecnológicos reproductivos. Se ha descrito que los espermatozoides equinos son extremadamente sensibles a los cambios celulares inducidos por el almacenamiento en frío inducido por medios hipertónicos y al estrés osmótico inducido por cambios en la presión osmótica. en este proceso (Ali, Bilodeau y Sirard, 2003).

Además, el estrés osmótico se asocia con efectos adversos sobre la motilidad, la viabilidad y el potencial de la membrana mitocondrial en el esperma equino, lo que puede estar relacionado con el estrés oxidativo y el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido al choque térmico. Así como las propiedades químicas del crioprotector utilizado; cambios en la disponibilidad y actividad de los antioxidantes endógenos debido a la eliminación del plasma seminal y cambios estructurales en los antioxidantes debido a los efectos térmicos y tóxicos del proceso (Serres, 2015).

Actualmente, la industria equina busca tecnologías que ayuden a preservar el esperma, por lo que los investigadores están haciendo cada vez más esfuerzos debido a la necesidad de un método que preserve las características genéticas del esperma durante la reproducción. Por ello, se están realizando investigaciones para mejorar estas biotecnologías reproductivas, como la criopreservación de espermatozoides (Wernli, 2010).

Por otro lado, Canero et al. (2018) demostró que la CoQ10 tiene un efecto positivo a regular y reducir el estrés oxidativo en los espermatozoides. Por ende, los estudios han demostrado que los espermatozoides refrigerados durante 12 a 72 horas no mostraron cambios significativos en los espermatozoides después de 24 horas, ya que el diluyente se encarga de proporcionar los componentes que los mismos necesitan para mantener su función. Sin embargo, los parámetros funcionales disminuirán después de 48 horas de refrigeración, por lo que no se recomienda almacenar semen de caballo en el frigorífico por un período de tiempo más largo (Giraldo et al., 2006).

Por otro lado, Ortiz (2022) determino que la vitamina K establece formas naturales como la filoquinona y una gama de moléculas llamadas menaquinonas, por ende, esta se conoce como un cofactor importante para la carboxilación de residuos de ácido glutámico en muchas proteínas dependientes de la vitamina K implicadas en la coagulación, el metabolismo óseo, la prevención de la mineralización vascular y la regulación de diversas funciones celulares. Por lo tanto, en la cría de equinos, esta proporciona el alcance necesario para la conservación del esperma mediante refrigeración y criopreservación estableciendo un canal directo a una biotecnología reproductiva importante. Así colabora en reducir o detener el metabolismo para prolongar la vida de los espermatozoides tras la eyaculación. Frente a lo cual se establece el siguiente objetivo general de la investigación: evaluar el efecto de la vitamina K y la coenzima Q10 en la mejora de los parámetros cualitativos y cinéticos del semen refrigerado.

## 2. Fundamento teórico

La conservación del semen parece ser una buena alternativa para preservar los rasgos del semental. En los caballos, los rasgos de selección genética se basan en el pedigrí y el rendimiento atlético, pero rara vez en la fertilidad (Miró, et al., 2011). El vínculo entre las causas de la infertilidad y el estrés oxidativo fue descrito en 1943, donde se demostró la sensibilidad de los espermatozoides a los radicales libres, que son antioxidantes, y el estrés oxidativo (Aitken, 1999), basándose en el equilibrio que existe entre la producción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y su desnaturalización en los tejidos (Canero et al., 2018).

Sin embargo, no se ha demostrado que los métodos de criopreservación sean particularmente efectivos para preservar la función de los espermatozoides, por lo que se están buscando formas de ayudar a preservar los espermatozoides (Lázaro et al., 2000).

La importancia de la coenzima Q10 se conoció en 1978 con Peter Mitchell, cuando explicó el mecanismo químico de la síntesis de ATP-trifosfato de adenosina en las mitocondrias, donde la coenzima juega un papel importante (Ocaña, 2020).

Fatma et al. (2017) Se ha demostrado que los efectos de la vitamina K sobre el desarrollo embrionario y la criosupervivencia in vitro mejoran la reexpansión embrionaria, así como su calidad y motilidad, porque la vitamina K actúa como una mitocondria transportadora de electrones en las células.

Además, las mitocondrias desempeñan un papel crucial en el desarrollo temprano de los embriones. Estudios han demostrado que una adecuada preparación de los folículos incrementa la probabilidad de que los embriones creados in vitro alcancen la etapa de blastocisto. De manera similar, los embriones presentan síntomas relacionados con la función mitocondrial, específicamente un aumento en la expresión génica, lo cual se ha observado y documentado en investigaciones previas (Baldoseda et al., 2014).

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

*Vitamina K:* Dado que las mitocondrias son parte importante de las células en el desarrollo embrionario, un medio insuficiente puede afectar la función de las mitocondrias, por lo que intentamos mejorar la suplementación de diferentes tipos de antioxidantes en el medio, aunque las mitocondrias son las responsables de la producción de reactivos. Las especies de oxígeno (ROS), pero también sensibles a ROS, causaron daños (Voss y cols 2012).

La vitamina K2 actúa como 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. Donde, se ha descrito que existe disfunción mitocondrial en ovocitos inmaduros y la adición de vitamina K2 aumenta los niveles de ATP, que son esenciales para el desarrollo embrionario in vitro (Fatemeh et al. 2017).

*Coenzima Q10:* Los estudios demuestran que la CoQ10 juega un papel importante en el transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna, por lo que es importante para combatir el estrés oxidativo (Arenas, 2001).

Se ha demostrado que la coenzima Q10 mejora el enfriamiento del espermatozoides al prevenir la peroxidación lipídica debido al estrés oxidativo no solo durante el enfriamiento y el posenfriamiento sino también durante la centrifugación. Además, el uso de CoQ10 es una buena solución para enfriar el espermatozoides de caballo (Elgueta, 2018).

*Conservación Espermática:* Actualmente, la tecnología de conservación del espermatozoides de caballo se utiliza en la cría moderna. Pues, tiene ventajas sobre el semen fresco: por ejemplo, el espermatozoides de semental se puede utilizar tanto para la reproducción y la mejora genética. Aunque la desventaja de este método es la capacidad de transporte limitada, está relacionada con cambios en los niveles de espermatozoides después de una congelación prolongada. Pero reduce la posibilidad de enfermedades, deformidades y otras condiciones que pueden afectar la cría moderna de estos sementales (Astrid, 2015).

*Agentes Crioprotectores:* Son sustancias hidrosolubles y poco tóxicas que bajan el punto eutéctico de la solución en la que se incorporan, que es la temperatura más alta a la que el disolvente produce la máxima cristalización. Un punto eutéctico bajado 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 función de los espermatozoides, de los que se distinguen algunos tipos como los azúcares, alcoholes y dimetilsulfóxido, aunque también pueden dividirse en permeables e impermeables a (Ramonés et al., 2007).

*Agentes Crioprotectores permeables (ACP):* Tiene un peso molecular bajo y es capaz de penetrar películas delgadas. Tienen alta movilidad y ayudan a deshidratar las células a bajas temperaturas, ayudando así a reducir la formación de cristales de hielo intracelulares, e incluyen: glicerina, propilenglicol y dimetilsulfóxido (Ávila et al. 2006).

Los crioprotectores son sustancias solubles en agua y poco tóxicas que reducen el punto eutéctico. Es decir, refleja una combinación determinada de A y B que se solidifica en elementos puros de una solución determinada. Por ello, los solutos se introducen a baja temperatura, por lo que la célula se deshidrata más y el gradiente osmótico que experimenta es menor (Astrid, 2015).

Además, bioquímicamente se pueden distinguir tres tipos de crioprotectores, alcoholes metanol, etanol, propanol, 1-2 propilenglicol y glicerina, azúcares como, glucosa, lactosa, sacarosa, sacarosa y dimetilsulfóxidos que se pueden dividir en penetrantes y no penetrantes (Elgueta, 2018).

En resumen, cuando hay diferencia de concentración, el agua fluye por ósmosis a través de la membrana semipermeable hacia el exterior de la célula, aumentando la concentración de sales internas. Por tanto, a medida que aumenta la concentración de la solución salina en el interior de la célula, la temperatura a la que se forma el hielo disminuye: será más difícil que el agua de la célula se congele y dañe su estructura (Miró, 2011).

Por ende, el grado de protección otorgado a las células está directamente relacionado con el grado en que se unen al agua molecular. Cuanto mayor sea la afinidad, menos agua

habrá disponible para una cristalización dañina. Además, estos productos se combinan con nutrientes líquidos que forman una mezcla helada. Desafortunadamente, la concentración de crioprotectores es tóxica para los tejidos a temperatura ambiente, por lo que durante el procedimiento de congelación se debe observar un cierto tiempo de exposición del material a 4°C, para que el agente protector comience a penetrar el tejido antes de la congelación, sin llegar a él especificado y se logre controlar el nivel de toxicidad. Asimismo, al realizar técnicas de descongelación, antes de utilizar el material, se debe lavar minuciosamente con un medio nutritivo en concentración reducida de crioprotector para eliminarlo por completo y así evitar efectos tóxicos (Martínez, 2023).

*Agentes Crioprotectores no permeables (ACNP):* Son compuestos moleculares de gran tamaño que son incapaces de atravesar la membrana plasmática, por lo que su efecto protector se refleja en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos y asegura una rápida deshidratación, reduciendo así la formación de cristales y aumentando así la supervivencia de los espermatozoides (Elgueta, 2018).

Se caracterizan por su alto peso molecular y ayudan a eliminar el líquido intracelular utilizando diferencias en la presión osmótica sin ingresar a las células. Los ACNP se utilizan a altas velocidades de enfriamiento (15.000 a 20.000 °C/min). En ACNP se encuentran monosacáridos como la glucosa, dextrosa, dextrano, fructosa, lactosa, también disacáridos como sacarosa y trehalosa, además de trisacáridos rafinosa y otros compuestos como polivinilpirrolidona (PVP), alginol, sorbitol, entre otro (Raheja, et al., 2018).

Además, la glucosa forma parte del crioprotector impermeable, tiene un alto peso molecular, por lo que no encaja en la membrana y contribuye al aumento de la presión osmótica efectiva en el medio fuente. Bhat et al. (2020) demostraron que el uso de 3-O-metilglucosa, un azúcar metabolizable formado a partir de glucosa, y la adición de tris a una dilución de 5 mmol/L de 3-O-metilglucosa dio resultados satisfactorios para la viabilidad post-descongelación - yema de huevo - glicerol, pero el mecanismo de interacción no está claro. Para contrarrestar los efectos tóxicos provocados por el glicerol y la yema de huevo esto recomendaron el uso de sacarosa o trehalosa, ambos disacáridos que actúan como ACNP para prevenir el daño osmótico.

Estos azúcares actúan como diluyentes para crear un medio hipertónico que deshidrata las células antes de congelarlas y previene la formación de cristales de hielo intracelulares. Iqbal et al. (2018) encontraron que la suplementación con trehalosa (45 mM), YH (15%) y glicerol (5%) mejoró significativamente la membrana plasmática del espermatozoide y la integridad de la membrana acrosómica.

Por ende, en resumen, se tiene que estos son sustancias de alto peso molecular que resultan muy eficaces para la criopreservación e vitrificación a alta velocidad y favorecen la rápida deshidratación de las células. Se trata de compuestos que por su alto peso molecular no traspasan la membrana plasmática y tienen un efecto protector en el medio extracelular, ya que favorecen un entorno altamente osmótico, provocando la salida de agua de la célula (deshidratación) y evitando así la formación de cristales de hielo

intracelular (Ortiz, 2022).

Por tanto, los crioprotectores impermeables se dividen a su vez en crioprotectores de alto peso molecular y crioprotectores de bajo peso molecular. Entre los de alto peso molecular se incluyen: polímeros como el alcohol polivinílico, el polietilenglicol, los polisacáridos y la polivinilpirrolidona, se incluyen: monosacáridos, disacáridos como la sacarosa que actualmente es la más utilizada, trehalosa, glucosa y galactosa a altas concentraciones 100 a 500 mM de trisacáridos como la rafinosa pueden ser tóxicas para las células (Galarza et al., 2018).

### 3. Metodología

#### 3.1. La zona de estudio

La presente investigación se desarrolló en la provincia del Azuay Cantón Cuenca, en la Universidad Católica de Cuenca, en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias la misma que se encuentra ubicada en la Panamericana Norte Km 2½ (Maps, 2017). La colección del semen de los caballos 1 y 2 se realizó en la “Hacienda el Cortijo” parroquia Checa, la colección del semen del caballo 3 y 4, se realizó en la “Hacienda el Paso” en el Cantón Nabón (Charqui).



#### 3.2. Diseño experimental

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.

#### 3.3. Descripción del proceso realizado

##### 3.3.1. Etapa 1

Primero, se seleccionaron cuatro sementales para la recolección de semen. Para este propósito, se utilizó una vagina artificial, la cual estaba equipada con un filtro de malla de nailon para la recolección del esperma. Después de la recolección, se separó una porción del gel del esperma.

### **3.3.2. Etapa 2**

Luego 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.

### **3.3.3. Etapa 3**

Para observar la concentración de espermatozoides, se colocó 95 µl de agua y 5 µl de esperma diluido en un tubo Eppendorf, donde se agregó 10 µl. A fin de centrifugar y enviar al laboratorio para su procesamiento y análisis destinado a evaluar parámetros cinéticos y cualitativos. Esto a través del diluyente CRIO RAMP 100. En este punto se agregó 25 micromoles de coenzima Q10 y 250 micromoles de vitamina K previo a la refrigeración del semen. Después de agregar estos componentes se analizó la calidad y las propiedades funcionales del esperma fresco y refrigerado por 24 y 48 horas después para comprobar el estado y funcionalidad de los espermatozoides, incluidos parámetros como la vitalidad y motilidad.

### **3.4. Alcance y los objetivos del estudio**

En cuanto al alcance del estudio es importante resaltar lo establecido por Canero et al. (2018) el cual deja en claro que actualmente se está investigando la suplementación con coenzima Q10 para mejorar la conservación del esperma en los sementales, ya que la suplementación con coenzima Q10 es beneficiosa para el mantenimiento del esperma. Los estudios muestran que el aumento de CoQ10 reduce el estrés oxidativo y, altera los parámetros del esperma (Restrepo, Úrsuga y Rojano, 2013).

En este contexto, la suplementación con vitamina K es beneficiosa para la maduración de los ovocitos y la calidad del embrión, y un entorno bajo en calcio se describe como esencial para la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, dependiente de la proteína G-glutamylcarboxilasa (GGCX) y de la proteína Gla de la matriz (MGP) a la vitamina K, que es esencial para regular la señalización del calcio y ayudar a la maduración de los espermatozoides (Zhang et al., 2019).

Con lo anteriormente expuesto se determina que el alcance de esa investigación está enfocado en evaluar si la vitamina K y la coenzima Q10 favorecen en la refrigeración del semen. Para ello se busca partir de objetivos con carácter general enfocado en evaluar el efecto de la utilización de la vitamina K y coenzima Q10 en la refrigeración del semen equino. Y específicos centrados en cuantificar el efecto de la vitamina k y la coenzima Q10 en los parámetros cualitativos y cinéticos de semen equino refrigerado. Así como, evaluar la capacidad de la vitamina K y la coenzima Q10 para mantener en el tiempo los parámetros de calidad espermática en semen equino refrigerado. Y examinar el efecto protector de la vitamina K y coenzima Q10 en las mitocondrias de los espermatozoides refrigerados en las primeras 0, 24 y 48 horas.

### **3.5. Criterios de inclusión y exclusión**

**Inclusión:** para los criterios de inclusión, se tomaron en cuenta los espermatozoides con motilidad, la concentración, volumen normal, espermatozoides con vitalidad y con progresividad.

**Exclusión:** para los criterios de exclusión, no se consideraron los espermatozoides con baja motilidad, concentración, bajo volumen, sin progresividad, espermatozoides sin vitalidad y sin progresividad.

### **3.6. Unidades experimentales**

El estudio se organizó mediante un diseño al azar en factores A y B con arreglo de tratamiento factorial (3 x 3) tres tratamientos a tres tiempos y sin interacción. La extracción de esperma en diferentes semanas se consideró como un efecto de bloqueo y se representó en réplicas. Para ello se empleó un análisis de varianza (ADEVA)

Se utilizó como unidad experimental 50 ml de semen diluido, extraído durante 4 semanas, y se evaluó cada nivel de CoQ10 y vitamina K, y el grupo control durante 7 días; un total de 100 observaciones.

### **3.7. Variables independientes**

Vitamina K, Coenzima Q 10

### **3.8. Variables dependientes**

Dentro de las variables dependientes se tiene la motilidad, vitalidad, anormalidades, integridad de la membrana, funcionalidad de la membrana, integridad mitocondrial.

### **3.9. Materiales para la Colecta en Campo:**

En los materiales de colecta en campo se tuvo, caballo, vagina artificial, calentador de agua, filtros, agua ultrapura, tubos de 50 ml, venda elástica, termómetro, recipiente graduado, vasos de precipitación y papel Aluminio.

### **3.10. Materiales de Laboratorio:**

Por otro lado, para los materiales de laboratorio destacan, microscopio, placa térmica, pipetas, tubos Eppendorf, porta y cubreobjetos, tubos de 15 ML, microscopio de fluorescencia, yema de huevo, jeringas de 3 – 10 ml, Eosina, Nigrosina, HOST, Yoduro de Propidio, Rodamida.

### **3.11. Procedimiento de la colecta de semen**

Preparación de la vagina artificial: 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 pielares para evitar golpear al reproductor, luego se ató la cola hacia adelante para evitar la penetración. Una vez recogido el semen, se colocó en un vaso de precipitados.

Posterior a ello se registró el volumen de semen colectado ml, se diluyó en proporción 1:1, con disolvente de transporte a 37 °C y se pasó a los tubos de 50 ml estériles los mismos fueron transportados al laboratorio.

### **3.12. Evaluación seminal**

Para la evaluación seminal, primero, se calibra la placa térmica a 35-37°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.

### **3.13. Concentración**

Para determinar la concentración espermática, se tomó un tubo eppendorf al que se añadieron 95 microlitros de agua y 5 microlitros de semen, mezclando bien esta solución 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 el número promedio en la muestra original como en la muestra diluida.

### **3.14. Centrifugación**

Para la centrifugación, se tomaron 10 ml de semen en cada tubo y se colocaron en la centrífuga, ajustando la velocidad a 800 x g 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.

### **3.15. Tinciones**

#### **Eosina Nigrosina (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.

### **3.16. TEST DE HOST**

Para realizar el test de HOS (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 los espermatozoides que respondieron positivamente como el total observado, contabilizando al menos 100 espermatozoides por placa para obtener una muestra representativa.

### **3.17. TEST YODURO DE PROPIDIO**

Para realizar el test de yoduro de propidio, primero utilizamos un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 405nm. Se preparó un tubo eppendorf en el que mezclamos 50 microlitros de semen con 5 microlitros de yoduro de propidio al 0,1%. 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, esta tinción indica la integridad de la membrana, mientras que aquellos que no absorbían el tinte se consideraban espermatozoides vivos.

### **3.18. TEST DE RODAMIDA**

Para el test de Rodamina, se utilizaron 50 microlitros de semen mezclados con 2 microlitros de Rodamina al 0.1% 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.

#### 4. Resultados y discusión

En la Tabla 1 se proporciona un análisis detallado de los tres parámetros principales del esperma puro: volumen, motilidad y concentración de esperma, basado en la evaluación de cinco colectas por cada caballo. Este análisis mostró que el volumen de espermatozoides se mantuvo relativamente constante con un valor alto de  $121,00 \pm 4,74$ , lo que muestra la homogeneidad del volumen de espermatozoides producido por cada muestra. Por otro lado, la motilidad de los espermatozoides más alta fue el caballo tres que se mantuvo en  $92,20 \pm 1,82$ , lo que indica diferencias en la motilidad de los espermatozoides entre las muestras estudiadas.

Se ha demostrado que los valores como el volumen y la motilidad de los espermatozoides son importantes pues reflejan la capacidad antioxidante general, la cual debe preservarse cuando se refrigeran los espermatozoides de esta especie. Esto garantizará aún más la eficiencia de la reproducción utilizando estas muestras refrigeradas (Suárez, 2017).

Del mismo modo, la concentración más alta estuvo en el caballo número dos la cual es de  $115,60 \pm 17,07$  añadido a esto el número total de espermatozoides eyaculados es de aprox.  $1398,19 \times 10^6$ . La variabilidad de las muestras que para efectos de análisis se proyectaron en los símbolos a, b en la tabla, lo cual indica diferencias potenciales significativas, que pueden influir en la selección de reproductores en función de criterios de calidad del esperma.

El caballo 1 mostró que tenía la concentración de esperma más baja, pero la motilidad más alta, lo que indica que los espermatozoides estaban muy activos, aunque en cantidades más pequeñas. El caballo 2 mostró el mayor volumen y la segunda mayor motilidad, evidenciando un buen equilibrio entre cantidad y calidad de esperma. El caballo 3 muestra el promedio en todas las categorías representando la letra del medio. Y el caballo 4 se mostró ligeramente por debajo del promedio en tamaño y movilidad, pero aún mantenía una concentración saludable de semen. Denotando que en la motilidad no hubo diferencia alguna.

Siendo importante resaltar en este punto que la coenzima Q10, representa una ubiquinona es un antioxidante natural y un cofactor en la producción de trifosfato de adenosina (ATP) mitocondrial. Sin embargo, no está claro pues en la mayoría de los estudios recomiendan dosis adicionales de 100 a 300 mg por día (Shane-McWhorter, 2023).

Por tanto, como antioxidante, inhibe la formación de radicales libres y protege las células del daño. Para, Martínez (2023) la coenzima Q10 está estrechamente relacionada con la fertilidad, ya que esta sustancia se concentra especialmente en las mitocondrias, que desempeñan un papel crucial en el proceso de concepción. Esta es similar a las vitaminas se caracteriza por ser liposoluble y está presente en todas las células de los seres vivos.

Se están realizando una serie de estudios a nivel mundial para mejorar el proceso de congelación del esperma de caballo y buscar sustancias que reduzcan el daño causado por el estrés oxidativo como la vitamina K para mejorar la comprensión de las moléculas y reducir el estrés de los espermatozoides durante la refrigeración y minimizan el daño a su

estructura, mecanismos moleculares y fisiología (Acosta, 2021).

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

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

N= número de colectas. Letras distintas en la misma columna muestran diferencias estadísticas significativas  $p < 0,05$  (a, b, c).

Esto concuerda con lo establecido por Carneiro et al. (2018), quienes evaluaron las propiedades antioxidantes de la coenzima Q10 (CoQ10) durante la criopreservación de espermatozoides de sementales con diferentes capacidades de refrigeración. En su estudio, los espermatozoides se criopreservaron utilizando diluciones sin CoQ10 como control. Los sementales se clasificaron en dos grupos: buena capacidad de congelación (GFA, por sus siglas en inglés, Good Freezing Ability), definido como una reducción de la motilidad total (TM) del espermatozoides en  $\leq 25\%$  ( $n = 7$ ), y baja capacidad de congelación (BFA, por sus siglas en inglés, Bad Freezing Ability), definido como una reducción de la TM en  $\geq 40\%$  ( $n = 5$ ), mediante una evaluación posterior a la descongelación de la motilidad total del espermatozoides (TM).

**Tabla 2.** Evaluación semen fresco (0 horas)

Tratamiento	N	Motilidad(%)	Vitalidad(%)	Anormalidades(%)	Funcionalidad de Membrana(%)	Integridad de Membrana(%)	Actividad Mitocondrial(%)
Control	20	87,30 $\pm$ 0,82	60,22 $\pm$ 2,08	5,08 $\pm$ 0,98	67,36 $\pm$ 11,03	60,37 $\pm$ 2,11	62,79 $\pm$ 2,18
Vitamina k	20	87,30 $\pm$ 0,82	60,38 $\pm$ 2,08	5,07 $\pm$ 0,98	83,04 $\pm$ 11,03	57,27 $\pm$ 2,11	61,62 $\pm$ 2,18
Coenzima Q10	20	87,30 $\pm$ 0,82	57,00 $\pm$ 2,08	5,84 $\pm$ 0,98	60,98 $\pm$ 11,03	55,18 $\pm$ 2,11	57,60 $\pm$ 2,18

N= número de colectas. Letras distintas en la misma columna muestran diferencias estadísticas  $\pm$  desviación estándar.

En este punto se analizaron varios parámetros básicos de la calidad del espermatozoides, incluida la motilidad, la vitalidad, las anomalías de los espermatozoides, la funcionalidad e integridad de la membrana y la actividad mitocondrial. Estos indicadores son esenciales para determinar la motilidad de los espermatozoides.

Aquí que en este caso se evidencia que los espermatozoides mostraron una consistencia significativa en la motilidad entre tratamientos con una media de  $87,30 \pm 0,82$  en los tres casos. Este alto grado de consistencia en la motilidad indica que los diversos tratamientos utilizados son eficaces para mantener activa la motilidad de los espermatozoides, que es un factor clave para una fertilización exitosa. Del mismo modo en cuanto al tema de vitalidad se tiene poca variación entre tratamientos, pues, el control (T1) tuvo una

viabilidad media de  $60,22 \pm 2,08$ , mientras que la vitamina K (T2) tuvo una viabilidad media ligeramente mayor de  $60,38 \pm 2,08$  y la Coenzima Q10 (T3) nuevamente tuvo una viabilidad inferior con valores en  $57,00 \pm 2,08$ . Estas diferencias sugieren que ciertos tratamientos pueden tener efectos pequeños pero significativos sobre la capacidad de los espermatozoides para mantener la viabilidad y la actividad, denotando que no existieron diferencias significativas.

Por ende, la frecuencia de anomalías en los espermatozoides también difirió entre los tratamientos, siendo el T2 el más bajo ( $5,07 \pm 0,98$ ) y el tratamiento 3 el más alto ( $5,84 + 0,98$ ). Esto sugiere que ciertos tratamientos pueden estar asociados con una mayor incidencia de espermatozoides irregulares, lo que puede afectar negativamente el desempeño reproductivo.

Esto concuerda con lo establecido por Restrepo, et al., (2024) donde determina que la composición del diluyente de semen equino es muy importante para la tolerancia criogénica de los espermatozoides y su capacidad para fertilizar después de la refrigeración o descongelación.

Además, en cuanto a la funcionalidad de la membrana, hubo diferencias entre tratamientos, destacando que la vitamina K ( $83,04 + 11,03$ ) conservó mejor la integridad de la membrana en comparación con el tratamiento 3 ( $60,98 + 11,03$ ). Del mismo modo, la actividad mitocondrial, para el soporte energético de los espermatozoides, mostró el valor medio más alto en cuanto a la vitamina K ( $61,62 + 2,18$ ) en el tratamiento 2, lo que indica que la capacidad energética se optimizó en este grupo.

Durante muchos años, han existido opciones de tratamiento de semen en la tecnología de reproducción asistida por humanos para mejorar la calidad. La tecnología se ha desarrollado ampliamente en la industria equina, aunque el espermatozoides congelado se utiliza menos que en otras especies debido a problemas con la supervivencia del espermatozoides y la variación individual. Esta diferencia individual también se ha confirmado entre razas. Para Elgueta (2018) la industria equina, la tecnología del espermatozoides artificial está bien desarrollada, aunque el espermatozoides refrigerado se utiliza menos que en otras especies debido a problemas con la supervivencia del espermatozoides y la variación individual. Esta diferencia individual también se ha confirmado entre razas. En general, sólo el 20-30% de los sementales producen espermatozoides con buena capacidad de refrigeración o congelación, donde aproximadamente el 40-60% con capacidades aceptables (aunque por lo general se ve afectado negativamente por la criopreservación cuando esta es prolongada por más de 24 horas) y otro 20-30% de los sementales no produce espermatozoides por completo. Estas limitaciones hacen que la inseminación artificial de espermatozoides congelado sea menos común en caballos que en otras especies, y encontrar sistemas y procedimientos de refrigeración y congelación adecuados sea uno de los principales objetivos.

**Tabla 3.** Evaluación semen refrigerado (24 horas)

Tratamiento	N	Motilidad	Vitalidad	Anormalidades	Funcionalidad de Membrana	Integridad de Membrana	Actividad Mitocondrial
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	20	87,30 ± 0,82	47,15 ± 3,20	6,08 ± 1,57	73,85 ± 9,17	66,40 ± 11,24	37,82 ± 13,26
Vitamina k	20	87,30 ± 0,82	45,33 ± 3,20	6,26 ± 1,57	53,98 ± 9,17	39,25 ± 11,24	19,49 ± 13,26
Coenzima Q10	20	87,30 ± 0,82	41,03 ± 3,20	6,50 ± 1,57	56,70 ± 9,17	35,53 ± 11,24	37,44 ± 13,26

N= número de colectas. Letras distintas en la misma columna muestran diferencias estadísticas ± desviación estándar.

Los datos de la tabla 3 proporcionan una representación clara que le da una definición a los datos recopilados frente a estos tres tratamientos en el esperma refrigerado por 24 horas. En este punto se denotan las diferencias en la actividad mitocondrial entre tratamientos, un aspecto clave en la evaluación de la calidad del esperma. Al observar a detalle los valores se evidencia que el control muestra el valor más aun cuando no persiste variabilidad significativa en la actividad mitocondrial (37,82 + 13,26) en comparación con los valores más bajos de los Vitamina K y Coenzima Q10. Esta diferencia visual en la actividad mitocondrial subraya su importancia. un parámetro como indicador del potencial energético de los espermatozoides, que es crucial para la motilidad y vitalidad de los mismos.

Además, se evidencia que varios parámetros del esperma después de refrigerado por 24 horas usando tres tratamientos diferentes mantuvieron la motilidad total de los espermatozoides, es decir, se mantuvo bastante estable en todos los tratamientos con un valor medio de 87,30 + 0,82. Esto indica que la refrigeración a las 24 horas no afecta significativamente la capacidad de movimiento de los espermatozoides. Del mismo modo, se tiene que las anomalías también fueron un factor importante a considerar, lo que sugiere que algunos espermatozoides pueden verse afectados a través de este proceso. Del mismo modo en cuanto a los parámetros de funcionalidad e integridad de la membrana se tiene que los mismos presentaron una variabilidad significativa en los tres tratamientos donde en el control hubo un aumento mientras que en el Vitamina K y la Q10 persistió una disminución significativa.

1. Tercer tiempo en base a las últimas 48 horas.

**Tabla 4.** Evaluación semen refrigerado (48 horas)

Tratamiento	N	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Anormalidades (%)	Funcionalidad de Membrana (%)	Integridad de Membrana (%)	Actividad Mitocondrial (%)
Control	20	87,30 ± 0,82	27,72 ± 16,25	11,12 ± 13,22	45,15 ± 13,95	26,51 ± 11,96	28,15 ± 17,12
Vitamina K	20	87,30 ± 0,82	29,63 ± 11,81	9,83 ± 12,64	43,16 ± 13,56	22,63 ± 11,94	21,91 ± 15,46
Coenzima Q10	20	87,30 ± 0,82	27,86 ± 14,90	11,71 ± 15,62	39,58 ± 14,30	22,01 ± 12,33	25,27 ± 22,62

N= número de colectas. Letras distintas en la misma columna muestran diferencias estadísticas  $\pm$  desviación estándar.

En la Tabla 4 se evidencia una disminución característica en los valores frente a las primeras 24 horas de refrigeración. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticas significativas. Al observar los valores en detalle, se puede ver que el tratamiento control y el tratamiento con Coenzima Q10 mostraron valores de actividad mitocondrial más altos en comparación con el tratamiento con Vitamina K, lo que sugiere que podría haber una tendencia a una mayor movilidad en los tratamientos control y Coenzima Q10.

Además, el cofactor CoQ10 se utiliza cada vez más como diluyente de esperma porque es un potente antioxidante y fuente de energía para los espermatozoides. Así mismo se han estudiado los beneficios de muy positivos de la coenzima, donde se han descrito dos tipos de coenzimas, la ubiquinona y el ubiquinol, ambas directamente relacionadas con el proceso oxidativo ya que, además de su acción antioxidante directa, favorecen la circulación de otros antioxidantes como la vitamina E o C, que reducen el daño de la membrana lipídica de los espermatozoides y otros tejidos corporales. Según estos autores del estudio, hay pruebas sólidas de que la suplementación oral con CoQ10 en sementales se asocia con una mejor calidad del esperma, ya que se observaron mejorías en ambos aspectos de la motilidad, particularmente en animales con menor motilidad basal (Freitas et al., 2018).

Con el fin de determinar el mejor momento para utilizar semen de caballo congelado para lograr una mayor probabilidad de preñez se llevaron a cabo pruebas para comprender el efecto del proceso de refrigeración sobre la función y la fluidez seminal. Se seleccionaron cinco caballos para este trabajo una vez por semana durante tres semanas. Cada muestra se evaluó en diferentes momentos de la siguiente manera: esperma fresco, 24 horas y 48 horas después del enfriamiento para pruebas de motilidad, fluidez e hiperosmolaridad. Los autores concluyeron que el esperma se puede almacenar en el frigorífico durante 24 horas sin cambios significativos o cambios en sus parámetros provocados por el efecto del diluyente sobre el esperma. Sin embargo, no se recomienda encarecidamente el almacenamiento prolongado de esperma para inseminación, ya que las propiedades que hacen que el esperma funcione se reducen significativamente después de 48 horas en el refrigerador (Giraldo y Correa, 2022).

## 5. Conclusiones

De los resultados se concluyó que el esperma equino puede almacenarse en refrigerador por 24 horas sin cambios importantes o significativos en sus parámetros en cualquiera de los tres métodos de tratamiento determinados.

Los diferentes tratamientos probados, por ejemplo, control y vitamina K mostraron resultados negativos en el esperma dentro de las 48 horas, lo que indica una reducción significativa en las propiedades funcionales del esperma.

El tiempo de enfriamiento afectó la integridad funcional de la membrana espermática, de  $53,98 \pm 9,17$  a  $43,16 \pm 13,56$  de 24 a 48 h en los tratamientos control, vitamina K y Q10, respectivamente. Indica que la integridad funcional de la membrana disminuye gradualmente durante las primeras 48 horas.

El tratamiento con Vitamina K mostró una mejor conservación de la integridad de la membrana espermática ( $83,04 \pm 11,03$ ) en comparación con el tratamiento con Coenzima Q10 ( $60,98 \pm 11,03$ ). Esto indica que la Vitamina K es más eficaz en mantener la integridad de la membrana durante la refrigeración del semen equino.

La actividad mitocondrial, que es crucial para el soporte energético de los espermatozoides, presentó valores más altos en el tratamiento con Vitamina K ( $61,62 \pm 2,18$ ) que en los tratamientos con Coenzima Q10. Esto sugiere que la Vitamina K puede optimizar mejor la capacidad energética de los espermatozoides refrigerados.

## 6. Bibliografía

- Acosta, M. (2021). *Evaluación de la integridad y funcionalidad espermática post-descongelación del caballo criollo*. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80273>
- 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)*. Universidad de la Salle. Obtenido de [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicina_veterinaria)
- Bhat, M., Blondin, P., Vincent, P., & Benson, J. (2020). *Low concentrations of 3-Omethylglucose improve post thaw recovery in cryopreserved bovine spermatozoa*. *Cryobiology*, 95, 15–19. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32619521/>
- Carneiro, J. ,.-D. (2018). *Efectos de la coenzima Q10 en la criopreservación de semen de sementales clasificados con buena o mala capacidad de congelación de semen*. Obtenido de <https://experts.illinois.edu/en/publications/effects-of-coenzyme-q10-on-semen-cryopreservation-of-stallions-cl>
- Delgado, O. (2019). *El plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Cuenca, Azuay*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11170/1/EI%20plan%20de%20desarrollo%20y%20ordenamiento%20territorial%20del%20canton%20Cuenca%20Azuay.pdf>
- Elgueta, C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatocitos equinos (Tesis de grado)* . Universidad de las Américas , Chile . Obtenido de <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Elgueta, C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatocitos equinos*. Obtenido de <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Freitas, M., Silva, T., & Almeida, P. (2018). *Calidad de semen fresco, refrigerado y congelado de sementales suplementados con antioxidantes y ácidos grasos*.

- Obtenido de Journal of Equine Veterinary Science. 46:1-6.:  
<https://horse1.es/es/component/tags/tag/q10>
- Galarza, D., López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). *Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. Animal Reproduction Science*, 192, 261–270. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432018301362>
- Giraldo, N., Correa, J., & Vasquéz, N. (2006). Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista Ces Medicina veterinaria y zootecnia*, 2(2). Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428499001.pdf>
- Iqbal, S., Naz, S., Ahmed, H., & Andrabi, S. (2018). *Cryoprotectant effect of trehalose in extender on post thaw quality and in vivo fertility of bull spermatozoa. Andrologia*, 50(1), e12794. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28224657/>
- Lázaro, E. (2000). *Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. Revista Cubana de investigaciones biomédicas*.
- Martínez, F. (2023). *Fragmentacion del ADN espermatico*. Obtenido de <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/27705/Natalia.pdf;jsessionid=4527B77CAA3DB6E07AEB592922B9E44E?sequence=6>
- Miró, A. M. (2011). Efecto del semental sobre las características seminales del Caballo de las Retuertas. 60(231), 345-348. doi:<https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000300007>
- Montiel, A., Hernández, J., Martínez, A., Posadas, J., & Rodríguez, J. (2022). *Características seminales antes y después de la criopreservación de seis razas de equinos en latitudes cercanas al Ecuador*. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2022000100012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2022000100012)
- Ocaña, C. (2020). *La sombra del elefante una historia de la coenzima Q10*. Obtenido de <https://naukas.com/2020/06/16/la-sombra-del-elefante-una-historia-de-la-coenzima-q10/>
- Ortiz, J. M. (2022). *Estrés oxidativo durante la conservación del semen equino*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=305762>
- Prefectura de Azuay, M. (2020). *Provincia del canton Azuay*. Obtenido de <https://www.theclimategroup.org/sites/default/files/2020-10/Azuay-Appendix->

Spanish.pdf

- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). *A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. Entomology and Zoology Studies, 6(3), 239–245.* Obtenido de <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue3/PartD/6-2-211-347.pdf>
- Restrepo, G., Úsuga, A., Montoya, J. D., Celis, Á., & Henao, A. A. (2024). *Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano.* Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-44492014000200008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492014000200008)
- Santillana, E. (2019). *Azuay* . Obtenido de <https://blog.santillana.com.ec/wp-content/uploads/2019/09/AZUAY.pdf>
- Shane-McWhorter, L. (2023). *Coenzima Q10 (CoQ10).* Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/professional/temas-especiales/suplementos-diet%C3%A9ticos/coenzima-q10-coq10>
- 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.* Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/59822/1017132099.2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wernli, J. (2010). *Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes. ( Tesis de grado).* Universidad de la Salle, Bogota. Obtenido de [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1240&context=medicina\\_veterinaria#:~:text=Seg%C3%BAn%20Weiss%20et%20al.,buena%20calidad%20de%20congelaci%C3%B3n%20seminal.](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1240&context=medicina_veterinaria#:~:text=Seg%C3%BAn%20Weiss%20et%20al.,buena%20calidad%20de%20congelaci%C3%B3n%20seminal.)



## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

**Juan Carlos Cabrera Saldaña**, portador de la cédula de ciudadanía N° 0105709489 En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Evaluación de la Vitamina K y Coenzima Q10 en la refrigeración 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, **12 de julio de 2024**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Carlos Cabrera Saldaña'.

**Juan Carlos Cabrera Saldaña**  
C.I . 0105709489