Efecto De La Cafeína, Pentoxifilina Y Heparina En La Criopreservación De Semen Equino

Neider Madero Ovejero, 1116042940,

Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias,

Universidad de Pamplona

2025

Efecto De La Cafeína, Pentoxifilina Y Heparina En La Criopreservación De Semen Equino

Neider Madero Ovejero, 1116042940,

Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias,

Universidad de Pamplona

Tutor

DMV, MSc, PhD Pablo Eduardo Ocampo Ortiz

2025

Lista de abreviaturas

MT	Movilidad total
MP	Movilidad progresiva
VSL	Velocidad lineal
VCL	Velocidad curvilínea
VAP	Velocidad media
ALH	Desplazamiento lateral de la cabeza
BCF	Frecuencia de batido de la cola
LIN	Índice de linealidad
STR	Índice de rectitud
PM	Penetración de la mucosidad
PTX	Pentoxifilina
CAF	Cafeína
HEP	Heparina
CT	Control
HOST	Integridad funcional de membrana plasmática
VIT	Integridad estructural de membrana plasmática
PMM	Potencial de membrana mitocondrial

Tabla de Contenido

Introducción **9**

Descripción del Sitio de Práctica **11**

Actividades Desarrolladas Durante la Actividad Práctica **13**

Criopreservación y Procesamiento de Semen 13

Procesamiento de Embriones In Vitro 13

Colaboración en la Enseñanza Práctica 14

Proyectos de Extensión 14

Medicina Preventiva y Terapéutica 14

Resumen **15**

Abstract **16**

Capítulo I **17**

Planteamiento del Problema 17

Justificación 19

Objetivos 22

Objetivo General 22

Objetivos Específicos 22

Capitulo II **23**

Introducción 23

Revisión bibliográfica 26

La Especie Equina y sus Utilidades 26

Comportamiento Sexual del Equino 27

Biotecnologías Reproductivas 28

Refrigeración Del Semen Equino 31

Criopreservación Del Semen Equino 32

Diluyentes Comerciales y Naturales 33

Agentes Capacitantes 35

Capitulo III 37

Metodología 37

Criterios de Inclusión y Exclusión 38

Obtención y Preparación de las Muestras 39

Centrifugación 40

Aplicación de Tratamientos 40

Almacenamiento 41

Evaluación 41

Movilidad, Cinética Espermática Y Penetración De La Mucosidad 41

Integridad Estructural de la Membrana Plasmática (Vitalidad) 42

Integridad Funcional de la Membrana Plasmática (Host) 42

Actividad Mitocondrial 43

Análisis Estadístico..... 43

Capitulo IV 44

Resultados 44

Discusión..... 55

Capítulo V..... 58

Conclusiones 58

Recomendaciones..... 59

Referencias Bibliográficas..... 60

Anexos 69

..... 69

Lista de Figuras

Figura 1 Obtención de Muestras y Respectiva Criopreservación Seminal. 37

Figura 2 Análisis Post descongelación 38

Figura 3 Matriz de diagramas de dispersión con las variables MT, MP, VAP, VSL, VCL. Correspondiente al tratamiento de cafeína y control. 44

Figura 4 Matriz de diagramas de dispersión con las variables VE, HOST, PMM Y PM en los diferentes tratamientos. 45

Figura 5 Matriz de diagramas de dispersión con las variables ALH, BCF, STR, LIN, RAPIDOS en los diferentes tratamientos..... 46

Figura 6 Matriz de diagramas de dispersión con las variables MT, MP, VAP, VSL, VCL. Correspondiente al tratamiento de heparina y pentoxifilina. 47

Figura 7 Efecto de diferentes tratamientos sobre la movilidad total espermática (%). 51

Figura 8 Efecto de diferentes tratamientos sobre la movilidad progresiva espermática (%). 51

Figura 9 Efecto de diferentes tratamientos sobre la vitalidad espermática (%)..... 52

Figura 10 Correlación entre las variables de calidad seminal y la prueba de penetración de la mucosidad con cafeína, control, heparina y pentoxifilina, respectivamente. 53

Lista de Tablas

Tabla 1 Análisis descriptivo del semen equino post descongelación. 48

Tabla 2 Análisis post descongelación por tratamiento del semen equino..... 49

Introducción

La medicina veterinaria es una disciplina esencial que se encarga del cuidado de la salud animal, desempeñando un papel crucial en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan tanto a animales domésticos como silvestres. Además, es fundamental en la inspección y control sanitario de los alimentos y en la prevención de zoonosis. La práctica profesional del médico veterinario en la Universidad de Pamplona brinda una preparación integral y completa que combina conocimientos teóricos con experiencias prácticas enriquecedoras, permitiendo a los estudiantes desarrollar las habilidades y competencias necesarias para abordar los desafíos complejos del sector veterinario. Esta formación abarca un amplio espectro desde la salud pública veterinaria hasta la gestión de la salud animal en contextos productivos, de conservación y protección del medio ambiente.

Cabe señalar que el aprendizaje es un proceso continuo, por lo que el acompañamiento constante de profesionales y especialistas en diversas áreas es fundamental para la consolidación de capacidades, son quienes brindan el apoyo necesario a los practicantes para que puedan identificar tanto sus fortalezas como las áreas en las que pueden mejorar en el ejercicio profesional. Esta orientación no solo favorece el crecimiento académico, sino que también impulsa el desarrollo personal, promoviendo un aprendizaje continuo y una integración efectiva al entorno profesional.

Entre las responsabilidades del Médico Veterinario se incluyen la dirección y ejecución de actividades dentro de los sistemas de producción animal. La pasantía práctica empresarial en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín representa una excelente oportunidad para profundizar en una de las áreas más especializadas de

la Medicina Veterinaria. Este laboratorio se enfoca en la investigación y aplicación de tecnologías avanzadas en reproducción animal, como la Criopreservación de semen y el procesamiento de embriones, siendo estas herramientas esenciales para mejorar la calidad genética y reproductiva de las especies. La experiencia adquirida en este entorno permite a los futuros profesionales de la Medicina Veterinaria aplicar sus conocimientos en situaciones reales, contribuyendo al avance de la investigación, la innovación y el desarrollo de técnicas que favorezcan tanto la sostenibilidad de la producción animal como la conservación de especies.

Descripción del Sitio de Práctica

Estación Agraria San pablo/ Laboratorio de Reproducción Animal

La Estación Agraria San Pablo está ubicada en la vereda El Tablacito en el municipio de Río Negro al oriente de Antioquía. Cuenta con una extensión de 27.5 hectáreas, se encuentra a 2.100 m.s.n.m y tiene una temperatura promedio de 15 °C. Este espacio pertenece a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, y está dedicado a diversas áreas de investigación y trabajo en el sector agropecuario. Entre sus principales actividades se destacan la avicultura, la porcicultura, procesamiento de concentrados para animales y el laboratorio de reproducción animal. El encargado de la estación agraria es el Zootecnista Otoniel de Jesús Ciro Cano, quien ejerce como coordinador; además, el laboratorio de reproducción animal está bajo la dirección del Zootecnista, Médico Veterinario, M. Sc y Ph.D. en Biotecnología, Giovanni Restrepo Betancur. Su equipo de trabajo está compuesto por un auxiliar de laboratorio, dos operarios encargados del servicio técnico para el manejo de los animales y estudiantes pasantes de diversas universidades del país. Del mismo modo, recibe apoyo de un grupo de docentes investigadores de instituciones como la Universidad de Antioquía, el Colegio Mayor de Antioquía, Politécnico Jaime Isaza Cadavid, y la Universidad CES**.**

El laboratorio de reproducción animal, adscrito al Departamento de producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, fue creado en 1980 como parte de un convenio con el gobierno suizo**.** Su objetivo inicial fue mejorar la producción de leche en las pequeñas y medianas ganaderías del departamento de Antioquía, promoviendo la difusión de la inseminación artificial mediante el uso de toros nacionales de alto valor genético. Hoy en día, la función principal del laboratorio es apoyar los objetivos misionales de la Universidad

Nacional que abarcan la docencia, la investigación y la extensión, siendo este un factor fundamental en el desarrollo de la industria ganadera regional, ofreciendo capacitaciones y asesorías a profesionales y productores.

Esta estructura permite desarrollar diversas investigaciones y trabajos en colaboración con estudiantes de pregrado, maestría y doctorado, contribuyendo al crecimiento y consolidación del laboratorio. Entre los servicios ofrecidos, se destaca la colecta y procesamiento de semen de diversas especies, incluyendo Bovinos, Equinos, Suinos, Caprinos, Caninos y animales en vía de extinción, como la Guagua, Oso de anteojos y la Zarigüeya, también se maneja la investigación in vitro de procesamiento de embriones y el mejoramiento genético de razas específicas como el Brahman, Angus, Inra 95, Blanco orejinegro y sus respectivos cruces (BRABON y BONGUS). Además, el laboratorio proporciona prácticas educativas a estudiantes de otras universidades, tanto dentro como fuera de Antioquía, impulsando la cooperación y el intercambio de conocimientos, lo que permite la formación de nuevos profesionales en el campo agropecuario.

Actividades Desarrolladas Durante la Actividad Práctica

En el laboratorio de reproducción animal de la Universidad Nacional, se realizó una variedad de actividades experimentales, de investigación, extensión, apoyo docencia, medicina terapéutica y preventiva. Estas actividades combinan investigación avanzada, servicios prácticos, educación y prevención, contribuyendo a la mejora continua de las prácticas reproductivas y de salud animal en el laboratorio y en la comunidad.

Criopreservación y Procesamiento de Semen

En el laboratorio, se realizó la recolección y evaluación del semen de diversas especies animales, empleando técnicas especializadas para asegurar su calidad. Se realizan análisis de motilidad, morfología y capacidad de fecundación para verificar que el semen cumpla con los estándares necesarios para su uso en procedimientos reproductivos. Una vez que el semen ha sido evaluado y se ha confirmado su calidad, se procede a la criopreservación. Este proceso implica la congelación del semen a temperaturas controladas, lo que garantiza su preservación a largo plazo sin perder su viabilidad. La criopreservación permite almacenar el material genético para ser utilizado posteriormente en inseminación artificial o en estudios de investigación.

Procesamiento de Embriones In Vitro

En el ámbito de la reproducción asistida, también se participa en el procesamiento de embriones in vitro. El proceso comienza con la recolección de ovocitos, los cuales luego se fecundan en el laboratorio. Después de la fecundación, se supervisa cuidadosamente el desarrollo de los embriones, asegurándose de que se mantengan en condiciones óptimas para su posterior transferencia a animales receptoras.

Colaboración en la Enseñanza Práctica

Como parte de mi labor, apoye directamente en la planificación, desarrollo y ejecución de prácticas académicas dentro del laboratorio. Me encargue de guiar a los estudiantes en la recolección de semen bovino, la realización de pruebas de motilidad y morfología, y el manejo de semen para procesos de criopreservación. También los supervise en el manejo de ovocitos, la fecundación in vitro y la manipulación de embriones, asegurando de que sigan los protocolos adecuados en cada procedimiento.

Proyectos de Extensión

También participe en proyectos de extensión que buscan acercar los servicios del laboratorio a la comunidad. A través de estos proyectos, se promueven la interacción entre el laboratorio y los productores o personas interesadas en mejorar las prácticas reproductivas de sus animales, brindando asesoramiento y facilitando el acceso a servicios veterinarios especializados.

Medicina Preventiva y Terapéutica

Una parte importante de mi trabajo fue la atención veterinaria preventiva, la cual incluye actividades como la vacunación de los semovientes y el monitoreo regular de su salud reproductiva. Realizamos controles periódicos para detectar posibles problemas en el aparato reproductivo de los animales y, en caso necesario, intervenciones tempranas para evitar complicaciones o enfermedades.

Resumen

La criopreservación de semen equino es una herramienta fundamental en los programas de reproducción asistida, permitiendo conservar la fertilidad del semental y realizar inseminaciones artificiales en momentos óptimos. No obstante, este proceso puede inducir daños estructurales y funcionales en los espermatozoides, afectando su calidad. El presente estudio evaluó el efecto de tres moléculas cafeína, heparina y pentoxifilina suplementadas en el medio de congelación, sobre diversos parámetros espermáticos postdescongelación, como la motilidad, cinética y viabilidad. Para ello, 10 eyaculados de 5 equinos fueron colectados y diluidos en Equiplus®, diluyente compuesto por leche desnatada, solución tampón con azúcares y sulfato de gentamicina, posteriormente suplementados con cafeína, pentoxifilina, heparina y criopreservado a -196 °C. Una vez descongeladas las muestras se determinó la movilidad y cinética espermática VE, HOST, y PMM, MT, MP, VSL, VCL, VAP, ALH, BCF, LIN, STR. Se realizaron comparaciones de medias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. La suplementación con PTX mejoró la VE. La adición de cafeína redujo la MT, MP y VE. Mientras que la heparina no presénto ningún efecto. En definitiva, estas moléculas pueden mejorar la calidad espermática al ser adicionadas en concentraciones adecuadas.

***Palabras clave**: criopreservación, semen equino, cafeína, heparina, pentoxifilina.*

Abstract

Equine semen cryopreservation is a fundamental tool in assisted reproduction programs, allowing stallion fertility to be preserved and artificial inseminations to be performed at optimal times. However, this process can induce structural and functional damage to sperm, affecting their quality. This study evaluated the effect of three molecules—caffeine, heparin, and pentoxifylline—supplemented in the freezing medium on various post-thawing sperm parameters, such as motility, kinetics, and viability. To this end, 10 ejaculates from 5 horses were collected and diluted in Equiplus®, supplemented with caffeine, pentoxifylline, and heparin, and cryopreserved at -196 °C. Once the samples were thawed, sperm motility and kinetics were determined: VE, HOST, and PMM, MT, MP, VSL, VCL, VAP, ALH, BCF, LIN, and STR. Comparisons of means between treatments were performed using the Tukey test. PTX supplementation improved VE. The addition of caffeine reduced MT, MP, and VE, while heparin had no effect. In short, these molecules can improve sperm quality when added at appropriate concentrations.

Key words*: cryopreservation, equine semen, caffeine, heparin, pentoxifylline****.***

Capítulo I

Planteamiento del Problema

La criopreservación del semen es una técnica clave en la biotecnología reproductiva que permite la conservación de semen de alta calidad durante largos períodos. Esto facilita su posterior uso en inseminación artificial, garantizando la continuidad genética en diversas especies. No obstante, el proceso de congelación y descongelación impacta negativamente la calidad de los espermatozoides, alterando aspectos críticos como la motilidad, la progresividad, la cinética y la integridad de la membrana.

Debido a las condiciones del proceso, durante la criopreservación los espermatozoides enfrentan cambios bruscos en la temperatura y la osmolaridad, lo que favorece la formación de cristales de hielo. Este fenómeno afecta negativamente su motilidad y viabilidad disminuyendo de forma considerable su capacidad para fertilizar; esta problemática cobra especial importancia en especies de alto valor económico, como los equinos, donde la inseminación artificial es una herramienta clave en los programas de mejoramiento genético (Cruz y Jaramillo, 2016).

En el caso del semen equino, la congelación y descongelación comprometen la funcionalidad y la viabilidad de los espermatozoides, lo que disminuye las tasas de éxito en los programas de inseminación artificial. Por lo tanto, es crucial investigar alternativas que mejoren la calidad del semen durante la criopreservación, lo que optimizaría los resultados reproductivos.

Es por esto que la investigación de aditivos que puedan mitigar los efectos negativos de la criopreservación representa una oportunidad importante en este campo.

Dado lo anterior, el empleo de diluyentes ha sido considerado una estrategia útil para contrarrestar la baja actividad antioxidante del semen equino durante su congelación. Aunque numerosos estudios han analizado el efecto de diferentes compuestos antioxidantes sobre la resistencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación, son escasas las investigaciones que relacionan dichos efectos con la capacidad antioxidante total del diluyente utilizado (Duque, y col., 2017).

Compuestos como la cafeína, la pentoxifilina y la heparina se han identificado como posibles agentes que podrían influir positivamente en la motilidad y otros parámetros funcionales de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, el impacto específico de estos aditivos en el semen equino congelado y descongelado aún no ha sido suficientemente investigado.

Este proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto de estos compuestos como aditivos en el diluyente de congelación del semen equino, con el fin de mejorar parámetros clave como la motilidad, la progresividad, la cinética del movimiento y la integridad de la membrana de los espermatozoides. Además, se busca determinar cómo la inclusión de estos compuestos podría optimizar la capacidad fertilizante del semen, tanto en su estado congelado como descongelado.

Justificación

La criopreservación del semen es una herramienta fundamental en la biotecnología reproductiva, especialmente para la conservación de gametos de alta calidad que permitan la mejora genética y la preservación de especies.

Gracias a la criopreservación, es posible almacenar el material genético del semen por tiempo indefinido, lo que permite utilizar el semen de un reproductor incluso después de su fallecimiento mediante tecnologías de reproducción asistida como la inseminación artificial (IA). Además, en casos de semen de baja calidad o con escasa disponibilidad espermática, técnicas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) permiten optimizar el uso del semen de un semental (Luzko, y col., 2018).

Sin embargo, el proceso de congelación y descongelación de semen equino presenta desafíos significativos, ya que afecta considerablemente la motilidad, la progresividad y la integridad de la membrana de los espermatozoides, lo que reduce su capacidad fertilizante.

Cabe destacar que, las dos principales causas que disminuyen la calidad del semen durante el proceso de Criopreservación son el daño en la estructura de la membrana y el estrés osmótico, lo que provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana y, como consecuencia, la entrada de agua, iones y crioprotectores (Cruz, y Jaramillo., 2016).

Este problema impacta de manera directa los programas de inseminación artificial, esenciales para la mejora genética de caballos de alto valor. La capacidad de optimizar la calidad del semen equino, especialmente tras la criopreservación, es crucial para aumentar la eficiencia de la reproducción asistida y mejorar los resultados reproductivos en esta especie.

Con el propósito de, minimizar el daño causado durante la criopreservación de los espermatozoides, se utilizan crioprotectores, que son soluciones diseñadas para proteger a los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación. Estas soluciones deben tener una presión osmótica adecuada para reducir el daño a la membrana plasmática, no obstante, la toxicidad de ciertos crioprotectores puede limitar el éxito de la criopreservación (Consuegra., 2019).

Por ello, es necesario buscar compuestos que no solo protejan eficazmente al espermatozoide, sino que además no representen un riesgo para su funcionalidad. En la actualidad, las técnicas tradicionales de criopreservación de semen equino han demostrado limitaciones significativas en cuanto a la viabilidad espermática postdescongelación, afectando directamente las tasas de fertilidad. Por esta razón, surge la necesidad de investigar y desarrollar nuevas estrategias que optimicen la preservación de la integridad estructural y funcional de los espermatozoides.

La mejora de la calidad espermática tras la criopreservación no solo aumentaría las tasas de éxito de la inseminación artificial, sino que también contribuiría al progreso genético en especies de interés económico y deportivo. Las técnicas de reproducción asistida, como la inseminación artificial, se han convertido en un pilar en la cría y el manejo de equinos, por lo que la optimización de la criopreservación del semen tiene implicaciones directas en la producción animal y la preservación de genes valiosos.

A pesar de los avances en el campo de la criopreservación, la búsqueda de aditivos que puedan mejorar la funcionalidad de los espermatozoides durante el proceso sigue siendo un área de interés científico. Compuestos como la cafeína, la pentoxifilina y la heparina han sido

estudiados en otras especies, como el bovino y el porcino, su aplicación específica en la criopreservación de semen equino ha sido menos explorada.

En relación con esto, en bovinos, tanto la cafeína como la pentoxifilina se han empleado en los procesos de hiperactivación, capacitación y fertilización in vitro. Además, la cafeína ha demostrado estimular la capacitación y la reacción acrosómica en espermatozoides de verraco. En sementales, estudios previos han evidenciado que la cafeína ejerce un efecto estimulante sobre la motilidad de los espermatozoides epididimarios (Rota, y col., 2018).

Pero su impacto sobre el semen equino congelado y descongelado no ha sido completamente explorado. La investigación de estos compuestos podría abrir nuevas posibilidades para la mejora de la calidad espermática y la capacidad fertilizante de los espermatozoides, reduciendo los efectos adversos de la criopreservación.

El estudio propuesto tiene una relevancia directa en la biotecnología reproductiva y en los sectores asociados a la cría de caballos, pues permitiría establecer estrategias más eficientes para la conservación genética y mejorar las tasas de éxito reproductivo. La evaluación de la cafeína, la pentoxifilina y la heparina como aditivos en la criopreservación del semen equino podría ofrecer nuevas alternativas para optimizar los procesos de congelación y descongelación, garantizando que los espermatozoides mantengan sus capacidades fertilizantes a lo largo del tiempo. Así, este estudio contribuye al avance de la ciencia reproductiva y tiene el potencial de transformar las prácticas de inseminación artificial, generando un impacto positivo tanto en la ciencia como en la industria equina.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la cafeína, pentoxifilina y heparina en la criopreservación de semen equino, con el fin de potenciar la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Objetivos Específicos

Determinar el efecto de la cafeína, la pentoxifilina y la heparina como aditivos en el diluyente de congelación, sobre la motilidad, progresividad, cinética e integridad de membrana de los espermatozoides equinos criopreservados y descongelados.

Evaluar el efecto de la cafeína, la pentoxifilina y la heparina como aditivos en semen equino congelado y descongelado en la integridad de membrana, actividad mitocondrial y vitalidad de los espermatozoides.

Capitulo II

Introducción

Dentro de la especie equina la criopreservación del semen ha revolucionado la forma en que se aborda la reproducción asistida en la medicina veterinaria. Esta técnica, que permite conservar células espermáticas durante largos periodos sin pérdida inmediata de su capacidad fertilizante, abre la puerta a la inseminación artificial programada, a la conservación de líneas genéticas valiosas y a la reproducción cruzada sin la necesidad de contacto físico entre ejemplares. Sin embargo, su aplicación no está exenta de desafíos, a pesar de los avances en esta biotecnología, el proceso de congelación y descongelación del semen equino sigue siendo un desafío debido a los efectos adversos que estos procesos generan en la motilidad**,** progresividad **y** viabilidad de los espermatozoides durante la congelación.

Sharafi, y col., (2022) señalan que, aunque la criopreservación espermática se ha utilizado por más de cien años, los métodos actuales solo permiten que aproximadamente el 50 % de los espermatozoides conserven su viabilidad posterior al proceso. Esta reducción se debe a daños en distintos componentes celulares, como la membrana plasmática, el núcleo, las mitocondrias, las proteínas, el ARNm y los microARN. Para mitigar estos efectos negativos, se han empleado tradicionalmente aditivos químicos, tales como el glicerol, además de antioxidantes, ácidos grasos, azúcares, aminoácidos y estabilizadores de membrana. Sin embargo, estos enfoques no logran prevenir completamente el deterioro celular (p.1).

El proceso de congelación y posterior descongelación impone un fuerte estrés sobre los espermatozoides. Las drásticas variaciones de temperatura, la formación de cristales de hielo y los cambios en la osmolaridad afectan directamente la viabilidad, motilidad y estructura celular de los gametos. En otras palabras, el espermatozoide, lejos de permanecer intacto, sufre. Y esa

alteración silenciosa pero significativa se traduce en una reducción de su capacidad fertilizante. Sumado a esto, el estrés oxidativo se considera uno de los principales factores involucrados en estas alteraciones.

En consecuencia, el estrés oxidativo se reconoce como uno de los principales factores asociados a las alteraciones que se manifiestan en el semen equino tras la criopreservación. Este fenómeno se origina por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), generado tanto por el choque térmico como por la composición química de los crioprotectores empleados en el proceso. (Restrepo, y col., 2012).

Ante esta problemática, ha surgido la necesidad de encontrar alternativas que mitiguen los efectos negativos de la criopreservación. Entre las estrategias propuestas, una de las más prometedoras es la incorporación de aditivos bioactivos en los diluyentes utilizados para la congelación. Estos compuestos pueden funcionar como protectores celulares, moduladores del metabolismo o activadores del movimiento espermático, dependiendo de su naturaleza y mecanismo de acción.

Por esta razón, los diluyentes empleados en la congelación del semen están compuestos por agentes que regulan el pH, eliminan toxinas derivadas del metabolismo espermático, protegen frente a los cambios bruscos de temperatura, mantienen el equilibrio electrolítico y osmótico, previenen el crecimiento bacteriano y proporcionan energía. Asimismo, deben contener crioprotectores que impidan la formación de cristales de hielo dentro y fuera de las células. (Alvarenga y col., 2016).

Por esta razón, la mejora de los procedimientos de criopreservación es esencial para garantizar que el semen descongelado conserve su calidad y fertilidad. Así, el presente trabajo

tiene como objetivo principal evaluar el efecto de la pentoxifilina, la cafeína y la heparina como aditivos en el diluyente de congelación del semen equino, buscando mejorar parámetros clave como la motilidad, la cinética, la progresividad y la integridad de la membrana espermática. Al evaluar el efecto de la pentoxifilina, la cafeína y la heparina como aditivos en el diluyente de congelación del semen equino, se espera optimizar la calidad espermática postdescongelación.

Revisión bibliográfica

La Especie Equina y sus Utilidades

La especie equina, representada principalmente por el caballo (*Equus ferus caballus*), ha sido fundamental para el desarrollo de diversas civilizaciones a lo largo de la historia. Desde tiempos remotos, los caballos han jugado un papel crucial no solo como animales de trabajo, sino también como compañeros en actividades recreativas y deportivas. Su utilidad y capacidad de adaptación han hecho de ellos aliados indispensables para el ser humano en distintos contextos históricos (Muñiz, M., 2010).

Así mismo, el vínculo entre el hombre y el caballo ha evolucionado según las necesidades de cada época, reflejando la forma en que estos animales han sabido responder a los desafíos del entorno humano, ya sea en la agricultura, el transporte, la guerra, el deporte o la rehabilitación. Los caballos han dejado una huella profunda en la historia, la economía y la cultura de múltiples sociedades (Mihók y Montijano, 2016).

No obstante, hoy en día la especie equina con su gran versatilidad y adaptabilidad sigue siendo un recurso invaluable para la humanidad. A lo largo de los siglos, los caballos han dejado una huella imborrable en la historia, la economía, el deporte y la cultura mundial. Ya sea como animales de trabajo, compañeros en el deporte, o aliados terapéuticos, los caballos continúan siendo una parte esencial de nuestras vidas (Stern, C., y Chur-Hansen, 2019).

Además, el equino desempeña un papel fundamental en las terapias asistidas con caballos, ya que contribuye de manera significativa al bienestar emocional y mental de las personas. En la actualidad las terapias ecuestres son una metodología de rehabilitación cada vez

más común dentro del tratamiento que reciben personas con distintos tipos de discapacidades (Jiménez, A., 2018).

En este contexto, el caballo actúa como un agente motivador, generando un vínculo afectivo que impulsa la participación del paciente. Asimismo, su presencia ayuda a que los individuos enfrenten y superen sus temores, fortaleciendo su autoestima y la confianza en el equipo terapéutico. A medida que avanza el tratamiento, se observan mejoras en funciones cognitivas como la concentración, la atención y la memoria, lo cual repercute positivamente en el desempeño general del paciente en sus actividades diarias (Tandalla, B., 2023).

Comportamiento Sexual del Equino

La conducta sexual del semental se divide en cortejo y apareamiento. El cortejo son los patrones de conducta por los cuales el macho y la hembra se hacen saber que están listos para la cópula. Durante el cortejo los sementales detectan mediante los órganos de los sentidos las señales visuales, auditivas y olfatorias enviadas por la hembra. El semental se aproxima a la yegua y comienza su exploración olfatoria de frente a la yegua, así como de la región genital y de la orina. Con el contacto nasal el semental manifiesta el característico signo de Flehmen, que consiste en elevar la cabeza, replegando los labios de tal manera que muestre los dientes (Trejos, S., y Guzmán, R., 2009).

En este sentido. El apareamiento o cópula implica la erección, la monta, la introducción del pene a la vagina, los movimientos pélvicos por parte del macho, la postura de la hembra y la eyaculación del garañón. La eyaculación es un proceso secuencial que envuelve tres eventos: erección, emisión y eyaculación. La erección es el alargamiento y endurecimiento del pene,

como resultado del llenado del cuerpo cavernoso con sangre, así como también el cuerpo esponjoso (Montalvo, I., y Aguirre R., 2019).

En consecuencia, es durante estos momentos clave cuando se evalúa la libido del semental, colocándolo en contacto con la yegua en estro para observar su reacción. La experiencia sexual del semental depende de esta respuesta, así como del manejo adecuado del animal y, en algunos casos, del periodo reproductivo en el que se encuentre (McDonnell, S., 1986).

La mayoría de los sementales logran una erección en los primeros dos minutos de interacción precopulatoria, y montan un minuto después de ésta. Más del 70% logran eyacular en la primera monta, y más del 90% en la segunda. El 75% de las ocasiones la eyaculación ocurre luego de seis a ocho movimientos de fricción intra-vaginales profundos. Después de eyacular, el semental olfatea la región genital de la yegua y el Piso, respondiendo con micción y Flehmen (Vázquez, L., 2016).

Biotecnologías Reproductivas

La industria equina ejerce un importante papel como fuente generadora de empleo y renta. Las biotecnologías de la reproducción constituyen una valiosa herramienta para la mejora mundial en la especie equina. Dentro de las técnicas se encuentra la inseminación artificial (IA), que probablemente es la biotecnología con mayor impacto en la cultura equina (Canisso, y col., 2008).

En efecto, la inseminación artificial representa una herramienta clave para mejorar la eficiencia reproductiva de la especie, ya que posibilita un uso más racional de los reproductores,

elimina los riesgos asociados a accidentes durante la monta y permite un seguimiento constante del material seminal. Asimismo, proporciona la oportunidad de controlar eficazmente infecciones y enfermedades coitales (Misas, P., 1991).

En cuanto a su procedimiento, la inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva que consiste en la recolección de semen proveniente de un semental, caballo macho no castrado, seleccionado por su alto valor genético, para su posterior introducción en el útero de una yegua en fase de receptividad sexual, coincidiendo con el momento de la ovulación, con el propósito de lograr la fertilización (Olguín, y Esquivel., 2008). Sin embargo. "El éxito del proceso depende de algunas variables como es el uso de semen fresco, refrigerado y congelado" (Chamba, y col., 2017).

Por otro lado, la criopreservación del semen equino es una técnica biotecnológica que permite la conservación del material genético de sementales mediante la congelación del semen a temperaturas extremadamente bajas, generalmente en nitrógeno líquido a -196 °C. Este proceso facilita la preservación de la viabilidad espermática por períodos prolongados, posibilitando su uso posterior en programas de inseminación artificial y contribuyendo a la mejora genética y conservación de razas equinas (Vargas., 2013).

Con miras a mejorar la eficiencia reproductiva, la optimización de la criopreservación de esperma equino facilitará la conservación genética y la propagación de importantes estirpes equinas mediante reproducción asistida. La primera gestación obtenida con semen de semental congelado fue reportada en 1957 por Barker y Gandier. Sin embargo, el uso efectivo y generalizado de esperma equino congelado aún es limitado, principalmente debido a su asociación con baja fertilidad y resultados inconsistentes. (Devireddy, y col., 2002).

Cabe destacar que la capacidad de utilizar espermatozoides de sementales criopreservado ha aumentado el uso de la inseminación artificial en la industria equina. Una de las principales ventajas de usar semen criopreservado es que el semen puede ser almacenado y utilizado para inseminar yeguas en un momento posterior, cuando el semental no puede ser recolectado o incluso ha fallecido (Moore, y col., 2005).

En línea con lo anterior, los procesos de congelación de semen son conocidos por producir un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), a causa del desacoplamiento del metabolismo oxidativo normal de los espermatozoides. Se ha descrito que la criopreservación del semen conduce a la pérdida de la actividad de defensa antioxidante, principalmente a causa de la alteración de las enzimas antioxidantes (Restrepo, y Rojano., 2017).

Los diluyentes se han constituido como una alternativa para compensar las deficiencias antioxidantes del semen equino durante su congelación. Muchas investigaciones han estado dirigidas a evaluar el efecto de diversos aditivos con propiedades antioxidantes sobre la criotolerancia de los espermatozoides equinos; sin embargo, en limitadas ocasiones se ha relacionado dicha propiedad con la capacidad antioxidante total (CAT) del diluyente (Duque, y col., 2017).

Complementando lo expuesto, se espera que un diluyente sea capaz de preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides además de su motilidad; también debe tamponar la acidificación del medio consecuencia del metabolismo de los espermatozoides, proveerlos de nutrientes o sustratos metabolizables que aumenten su longevidad ya que les aportan energía, especialmente si están en condiciones ambientales desfavorables en las cuales no sobrevivía en condiciones puras (Abril, K., 2023).

Refrigeración Del Semen Equino

En el contexto de la reproducción asistida, la refrigeración del semen equino es una técnica que ha ganado popularidad en los últimos años debido a su capacidad para almacenar y transportar semen, manteniendo su potencial de fertilización por aproximadamente 24 horas. Para mejorar la conservación del semen, se han utilizado diluyentes, los cuales pueden incluir sustancias antioxidantes que ayudan a preservar su calidad durante el proceso de almacenamiento (Abril., 2024).

En este sentido, la refrigeración del semen equino ayuda a mantener una motilidad y concentración espermática adecuadas. Sin embargo, con el paso del tiempo, el vigor de los espermatozoides tiende a disminuir, lo que indica que, aunque esta técnica es útil a corto plazo, su efectividad disminuye con el tiempo (Valim, y col., 2024).

Por lo tanto, el uso de semen equino refrigerado resulta efectivo para conservar la viabilidad de los espermatozoides durante el transporte y almacenamiento, sin afectar su capacidad de fecundar. Esta técnica permite extender su vida útil hasta por 48 horas, siempre que se mantenga una temperatura mínima de 5 °C (Luzco, y col., 2021).

Teniendo en cuenta, que la refrigeración puede afectar la calidad del semen equino, es importante aplicar ciertos cuidados para mantener la viabilidad de los espermatozoides por más tiempo. Una forma efectiva de hacerlo es disminuyendo su actividad metabólica, lo cual se consigue al diluir el semen en un medio adecuado y reducir gradualmente la temperatura (Serrano., 2024).

En consecuencia, se ha determinado que el semen equino puede conservarse refrigerado durante 24 horas sin que se presenten alteraciones significativas en sus características, gracias al

efecto protector del diluyente; no obstante, su almacenamiento por más de 48 horas no es recomendable, ya que la funcionalidad espermática disminuye considerablemente (Giraldo, y col., 2006).

Criopreservación Del Semen Equino

De manera general, la criopreservación del semen equino permite preservar indefinidamente el material genético de un reproductor, lo cual resulta especialmente valioso al posibilitar su utilización en programas de reproducción asistida como la inseminación artificial, incluso después de la muerte del animal. En casos donde la calidad o cantidad de espermatozoides es limitada, técnicas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) permiten maximizar el aprovechamiento del material seminal disponible (Remezovski, y col., 2018).

En este sentido, la criopreservación de semen es un procedimiento clave en el avance de biotecnologías aplicadas a la reproducción asistida. Se utiliza en técnicas como la inseminación artificial y la producción de embriones, tanto por métodos in vivo como in vitro. Esta tecnología de conservación permite una amplia distribución y una correcta disponibilidad del material genético de ejemplares valiosos, lo que favorece la implementación de programas de mejoramiento genético (Benjamín, A, y col., 2013).

En consecuencia, la criopreservación de semen se enfrenta a diversos desafíos durante su proceso, ya que expone las células a estrés causado por las bajas temperaturas y desequilibrios osmóticos. Este tipo de estrés es principalmente resultado de la formación de hielo extracelular, aunque la adición de crioprotectores también puede generar este tipo de alteraciones, lo que pone en riesgo la viabilidad de los espermatozoides (Pérez, y col., 2017).

Sin embargo, la criopreservación del semen de sementales aún no ha logrado alcanzar la eficacia y los resultados exitosos observados en otras especies. Esto se debe, en gran parte, a que los espermatozoides de los sementales son más vulnerables al proceso de congelación, lo que provoca un aumento en el estrés oxidativo y daños en la membrana plasmática. Estos factores desencadenan múltiples mecanismos de daño celular que pueden terminar en la fragmentación del ADN y la muerte celular (Contreras, y col., 2020).

A pesar de los avances significativos, en la investigación sobre la criopreservación de semen equino, aún persisten lagunas en el conocimiento, particularmente en lo que respecta a la relación entre la reducción del estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación y su impacto en la calidad seminal resultante (Usuga, y col., 2016).

Diluyentes Comerciales y Naturales

Para comenzar, la composición de los diluyentes utilizados en la criopreservación del semen equino juega un papel crucial en la criotolerancia, así como en la capacidad fecundante de los espermatozoides después de la descongelación (Restrepo, B, y col., 2014).

Por lo tanto, los diluyentes empleados en la congelación del semen equino generalmente incorporan una base que proporciona energía, además de compuestos tampón, antibióticos y crioprotectores. Seleccionar el diluyente apropiado resulta fundamental para lograr una criopreservación exitosa (Caldevilla, y col., 2020).

En este sentido, los diluyentes más empleados en la criopreservación del semen equino se componen principalmente de leche en polvo sin grasa, glucosa y agua estéril. Otros diluyentes se basan en yema de huevo o leche descremada. La yema de huevo es uno de los crioprotectores

más efectivos que no penetra la célula, protegiendo a los espermatozoides del choque térmico; sin embargo, su eficacia varía según la especie (Alvarenga, y col., 2005).

En este contexto, algunos diluyentes comerciales se destacan por su amplio uso en la criopreservación del semen equino, así como por las numerosas investigaciones que han evaluado su efectividad. Tal es el caso de los diluyentes INRA 82 e INRA 96, los cuales están formulados con componentes como sales de Hanks, glucosa, lactosa, rafinosa, fosfocaseína, citrato sódico, citrato potásico y leche desnatada. Además, suelen ser suplementados con yema de huevo y glicerol para el proceso de congelación (Janett, y col., 2012, como se citó en Restrepo, y col., 2014).

Así mismo, se ha investigado la suplementación de los diluyentes con diversas sustancias proteicas que funcionan como crioprotectores extracelulares, tales como la yema de huevo, la albúmina sérica bovina, el suero equino, el suero bovino, la proteína de soya, el alcohol polivinílico y la leche descremada ultra pasteurizada. La combinación de los efectos beneficiosos de estas sustancias ha generado un enfoque significativo en la búsqueda de nuevas formulaciones de diluyentes que optimicen la conservación del semen equino (Henao, y col., 2013).

Asimismo, el medio diluyente Botucrio® para la congelación de semen equino emplea una combinación de glicerolmetilformamida como agente crioprotector, junto con una base enriquecida con 20 aminoácidos diferentes. Las evaluaciones in vitro realizadas con semen descongelado tratado con Botucrio® han mostrado una mejora en los parámetros de motilidad en comparación con aquellos diluyentes que utilizan únicamente glicerol como crioprotector (Tigse, V, A., 2023).

Por otro lado, el diluyente INRA 96 es un medio de conservación elaborado a partir de proteínas micelares purificadas de la leche, cuya capacidad para proteger a los espermatozoides respalda su eficacia y lo posiciona como un diluyente confiable (Tigse., 2023).

Agentes Capacitantes

En los mamíferos, los espermatozoides recién eyaculados son móviles y viables; sin embargo, no poseen aún la capacidad de fecundar al ovocito. Para que puedan cumplir esta función, es necesario que se produzca el proceso de capacitación, el cual constituye un prerrequisito indispensable previo a la fecundación. Este fenómeno ocurre *in vivo*, como resultado de la interacción de los espermatozoides con diversos factores presentes en el tracto reproductivo femenino (Risopatrón, y col., 2005).

Actualmente, a pesar de los importantes avances científicos, aún persisten muchas incógnitas sobre los mecanismos que inducen la capacitación espermática. Sin embargo, se ha logrado establecer que durante este proceso ocurren modificaciones lipoproteicas en la membrana celular, las cuales permiten que el espermatozoide responda a estímulos específicos y lleve a cabo la reacción acrosómica (Arenas, E, y col., 2010).

Por tal razón, los glicosaminoglicanos (GAG), como la heparina, presentes en el medio de cultivo, promueven la capacitación espermática y la reacción acrosómica *in vitro*, ya que facilitan la eliminación de componentes del plasma seminal que se encuentran adheridos a la superficie del espermatozoide (Palomino, G., 2019).

Asimismo, la heparina presenta una estructura similar a la de los glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son secretados en grandes cantidades en el oviducto y en los fluidos uterinos durante la fase folicular de la yegua. Esta similitud estructural sugiere que la heparina podría

participar en el proceso de capacitación espermática al facilitar la salida de colesterol y fosfolípidos desde la membrana espermática (Usuga, S, A., 2017).

De manera similar, la incorporación del glicosoaminoglicano heparina al medio de cultivo favoreció el inicio temprano del proceso de capacitación y la reacción acrosómica en los espermatozoides de sementales *in vitro*, un efecto que también ha sido reportado previamente en especies como bovinos, hámsters, humanos y conejos (Varner, D, y col., 1993).

Por otro lado, en equinos, los estudios han demostrado que la suplementación con pentoxifilina (PTX) incrementa los niveles intracelulares de AMPc en los espermatozoides provenientes del epidídimo, lo que a su vez se traduce en un aumento en el número de espermatozoides móviles (Guasti, P, y col., 2017).

En efecto, la incorporación de pentoxifilina en semen refrigerado pareció mejorar la motilidad total y progresiva de los espermatozoides en un rango estimado entre el 10 % y el 20 %, según observaciones visuales no cuantificadas. En cuanto al semen sometido a criopreservación y posterior descongelación, se evidenciaron diferencias significativas atribuibles al semental utilizado (Gradil, C. M., y Ball, B. A. 2000).

En consecuencia**,** se observó que la incorporación de 5 mM de cafeína al semen equino descongelado incrementó notablemente la motilidad de los espermatozoides y disminuyó los niveles de nitritos, lo que contribuyó a una mejora general en la calidad seminal y en las tasas de fertilidad tras la inseminación artificial en yeguas (Alves, N, y col., 2021).

Capitulo III

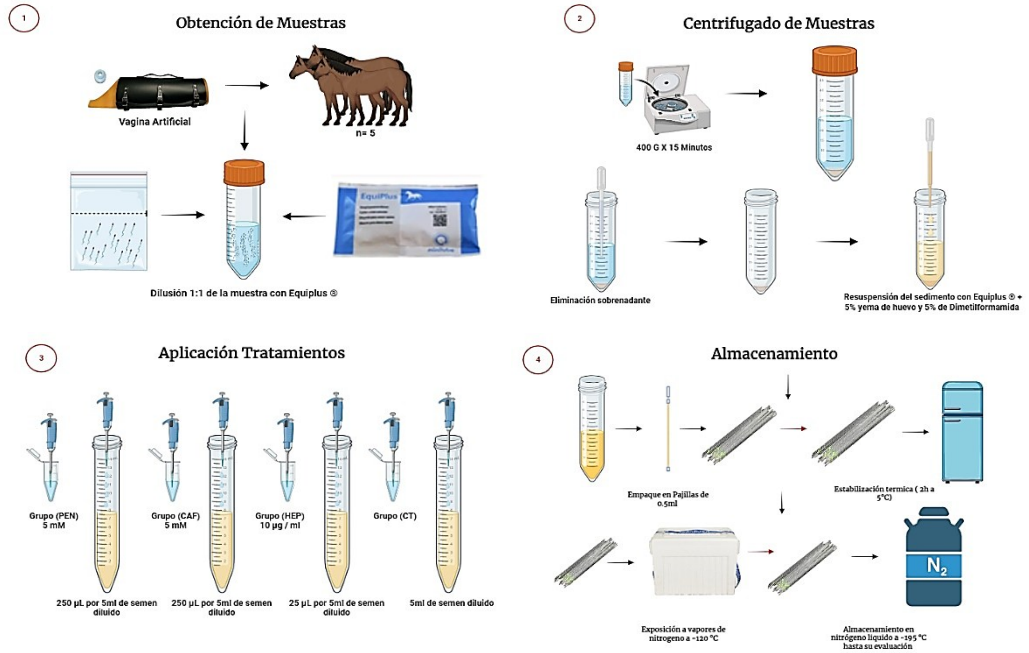
Metodología

Diseño Experimental

Resumidamente, el material seminal equino se obtuvo mediante vagina artificial para su posterior dilución con criopreservantes. Seguido a esto, la muestra se dividió en 4 fracciones a las cuales se les aplicaron los respectivos tratamientos, para poder ser sometido a criopreservación y almacenamiento (Figura 1).

Figura 1

Obtención de Muestras y Respectiva Criopreservación Seminal.

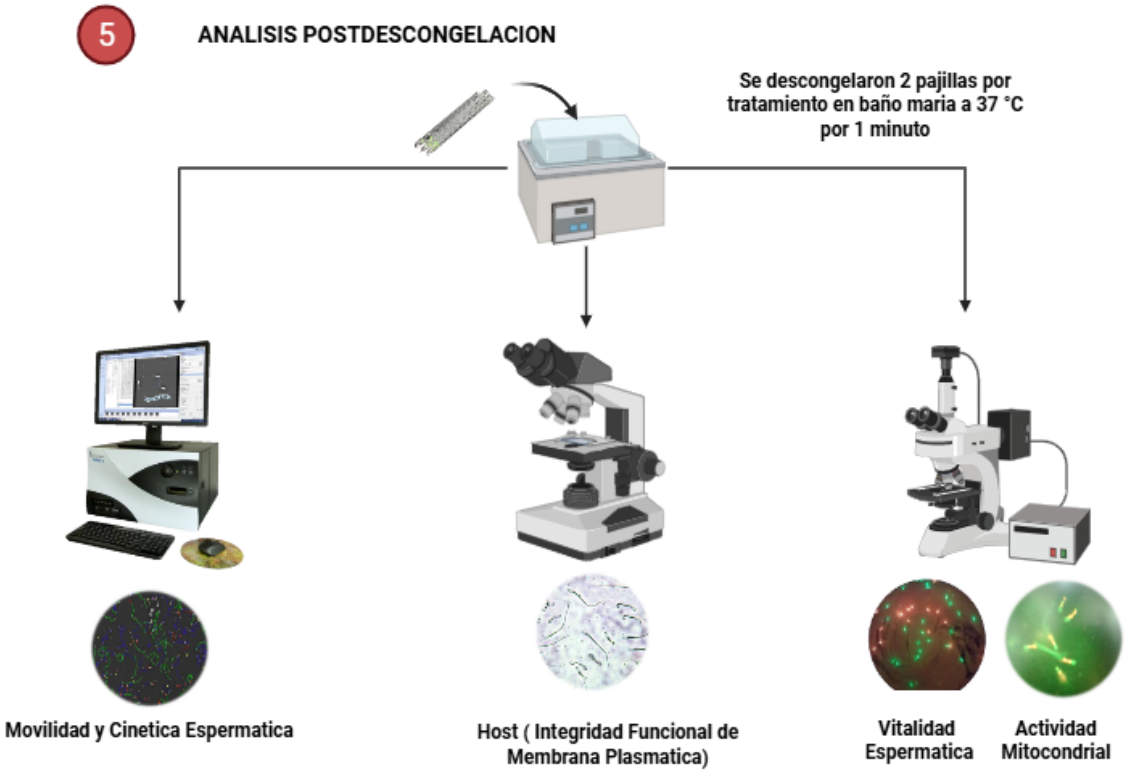


Nota. La imagen representa el proceso experimental aplicado a las muestras seminales equinas, desde su recolección hasta la criopreservación, incluyendo la distribución en los diferentes grupos de tratamiento. *Fuente:* Madero, 2025.

De forma resumida, se muestra el análisis post descongelación realizado a las distintas pajillas evaluadas con sus respectivos tratamientos (Figura 2).

Figura 2

Análisis Post descongelación



Nota. La imagen muestra los análisis realizados post descongelación de las diferentes pajillas correspondientes a cada uno de los tratamientos evaluados. *Fuente*: Madero, 2025.

Criterios de Inclusión y Exclusión

Los animales seleccionados fueron caballos de raza Criollo Colombiano, con un rango de edad entre los 4 y 7 años, específicamente aquellos que ya se encontraban en su periodo de vida útil reproductiva. Estos ejemplares no presentaban alteraciones, enfermedades previas o

trastornos reproductivos que comprometieran la calidad espermática y con fertilidad comprobada.

De igual manera, el material seminal de los animales utilizados fue evaluado previamente mediante el sistema CASA (de sus siglas en inglés: *Computer-Assisted Semen Analysis*) para garantizar la calidad de los eyaculados. Dentro de los parámetros tenidos en cuenta fueron, motilidad total superior al 50% y motilidad progresiva por encima del 25%. Valores inferiores a estos indican una capacidad cinemática y fertilizante comprometida y por ende la exclusión de dichos caballos de la investigación.

Asimismo, se tuvo en cuenta que estos animales no hubiesen recibido tratamientos con antibióticos en días previos, ya que dichos tratamientos pueden afectar la calidad de las muestras seminales. Por último, se garantizaron muestras libres de impurezas y que no presentaran aglutinación.

Obtención y Preparación de las Muestras

Para la investigación se colectaron 10 eyaculados provenientes de cinco caballos criollos colombianos ubicados en diferentes zonas del departamento Antioquia. La colecta del semen se llevó a cabo mediante el uso de una vagina artificial equina, modelo Missouri. Para cada colecta se excluyó la fracción gel por método de filtración con papel filtro de leche. Una vez colectado y filtrado el material seminal, se determinó la concentración de espermatozoides mediante un fotómetro previamente configurado para la especie equina, y se realizó la dilución a una proporción 1:1 en medio comercial Equiplus® la muestra fue transportada en una nevera isotérmica a una temperatura promedio de 5 °C hasta el laboratorio de reproducción animal, ubicado en la estación agraria San Pablo, en Rionegro.

Una vez en el laboratorio, se evaluó la movilidad y cinética espermática y, posteriormente se procedió a centrifugar para eliminar el diluyente de transporte y adicionar el medio de congelación a base de Equiplus®, 5% de Dimetilformamida (DMF) y 5% de yema de huevo centrifugada.

Centrifugación

El semen diluido fue centrifugado a 400G durante 15 minutos. Posterior a este proceso, mediante micropipetas se eliminó el sobrenadante, y el precipitado compuesto por las células espermáticas fue re-suspendido en el diluyente de congelación, ajustando la concentración a 100 millones de espermatozoides por mililitro.

Aplicación de Tratamientos

Para la suplementación de los tratamientos planteados, se prepararon alícuotas de los diferentes tratamientos para su adición al semen diluido. En el caso de la pentoxifilina, se preparó una solución *stock* a 100 mM, adicionando 250 µL de esta molécula al semen diluido, para un volumen final de 5 mL, logrando una concentración final de 5 mM de pentoxifilina (Alves, C., 2021).

De manera similar, para la cafeína se preparó una solución stock a 100 mM, suplementando 250 µL de esta solución al semen diluido, completando un volumen final de 5 mL, para una concentración final de 5 mM de cafeína (Mendoza, A., 2023; Alves, C., 2021).

En cuanto a la heparina, se preparó una solución *stock* a 2000 µg/mL, adicionando 25 µL a 5 mL de semen diluido, alcanzando una concentración final de 10 mM de heparina (Mendoza, A., 2023).

Como control, se utilizó el mismo semen diluido con Equiplus ®, 5 % de yema de huevo y 5 % de Dimetilformamida.

Almacenamiento

Tras aplicar los tratamientos, el semen se empacó en pajillas de 0,5 mL con empajilladora manual (*Pipettierhelfer micro-classic*) y se sometió a un proceso de estabilización térmica. Primeramente, se colocaron las pajillas durante 2 horas en un refrigerador a 5°C. Luego, se sometió a vapores de nitrógeno durante 15 minutos, para descender a una temperatura aproximada de -120°C, y finalmente, se sumergió en termos de nitrógeno líquido, donde se mantuvo almacenado a -196°C hasta su posterior descongelamiento para su evaluación seminal.

Evaluación

En cumplimiento de los objetivos específicos se realizaron las siguientes evaluaciones:

Movilidad, Cinética Espermática Y Penetración De La Mucosidad

La movilidad, cinética y penetración de la mucosidad de los espermatozoides equinos se evaluaron mediante una adaptación del protocolo propuesto por (Mesa, y col., 2012). Utilizando el sistema de análisis computarizado CASA (Hamilton Thorne Semen Analyser, HTM-IVOS, versión 12.3; Hamilton Thorne Research, Massachusetts, EE. UU.), equipado con una placa térmica ajustada a 37 °C. El sistema fue previamente configurado con información específica de la muestra, incluyendo volumen, dilución, campos de lectura y especie. Para la evaluación, se depositó una gota de 5 µL de semen sobre un portaobjetos precalentado a 37 °C y se cubrió con un cubreobjetos. Se analizaron al menos 500 células distribuidas en cinco campos distintos. Los parámetros evaluados incluyeron movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad

lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad promedio (VAP), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido (BCF), linealidad (LIN) e índice de rectitud (STR) y (PM) penetración de la mucosidad. (Anexo 1).

Integridad Estructural de la Membrana Plasmática (Vitalidad)

La viabilidad espermática se evaluó mediante una modificación del protocolo descrito por (Gamboa, y col., 2010), utilizando el kit Live/Dead (Molecular Probes Inc.). Para ello, se preparó una suspensión celular con una concentración de 20×10^6 espermatozoides/mL, la cual fue incubada durante 8 minutos a 37 °C con la sonda SyBR-14 a una concentración final de 6 mM. Posteriormente, se añadió yoduro de propidio (PI) a una concentración de 0.48 mM, seguido de una segunda incubación a la misma temperatura durante 7 minutos. Finalmente, se evaluaron 200 células espermáticas utilizando un microscopio de fluorescencia E200 con lámpara HBO (Nikon Inc., Japón), empleando longitudes de onda entre 550 y 595 nm. (Anexo 2).

Integridad Funcional de la Membrana Plasmática (Host)

La integridad funcional de la membrana plasmática se evaluó mediante el test de hinchamiento hipoosmótico (HOST), con modificaciones al protocolo descrito por (Neild, y col., 2000). La solución hipoosmótica fue preparada a base de sacarosa y agua destilada. Para la evaluación, se colocaron 200 µL de la solución HOST y 20 µL de la muestra de semen en tubos Eppendorf, los cuales fueron incubados durante 30 minutos en un baño María a 37 °C. Finalizada la incubación, se tomaron 5 µL de la mezcla, se colocaron sobre un portaobjetos con su respectivo cubreobjetos, y se contaron 200 espermatozoides por lámina utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc.). Esta prueba permitió determinar el

porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales, evidenciado por la curvatura o enrollamiento del flagelo como respuesta al medio hipoosmótico. (Basioura, y col., 2018). (anexo 3).

Actividad Mitocondrial

La actividad mitocondrial se evaluó mediante el uso de la sonda fluorescente específica JC-1 (MitoProbe™ JC-1 Assay Kit, Invitrogen), a partir de una modificación del protocolo descrito por (Guo, y col., 2017). Para ello, se tiñó una muestra de 30 µL de semen con la sonda JC-1 a una concentración final de 0.4 µM y posteriormente incubada durante 15 minutos a 37 °C. El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) se determinó mediante el análisis de 200 células espermáticas utilizando un microscopio de fluorescencia E200 con lámpara HBO (Nikon Inc., Japón), empleando longitudes de onda entre 550 y 595 nm. (Anexo 4)

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS Studio. Se realizó un análisis descriptivo general sobre la calidad del semen global y por tratamiento. Se realizó la prueba de Smirnov-Kolmogorov para evaluar la distribución normal de los datos y se realizaron transformaciones Arcoseno y logarítmicas para variables porcentuales y no normales. Se ajustó un modelo lineal mixto por tratamiento para cada variable dependiente, incluyendo el efecto fijo del tratamiento y el efecto aleatorio anidado del eyaculado dentro del equino Eyac (Equino). La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey. Se realizó un análisis de correlación entre las variables de calidad seminal y la prueba de penetración de la mucosidad como indicador de potencial fertilizante. Significancia estadística fue otorgada cuando $p<0.05$.

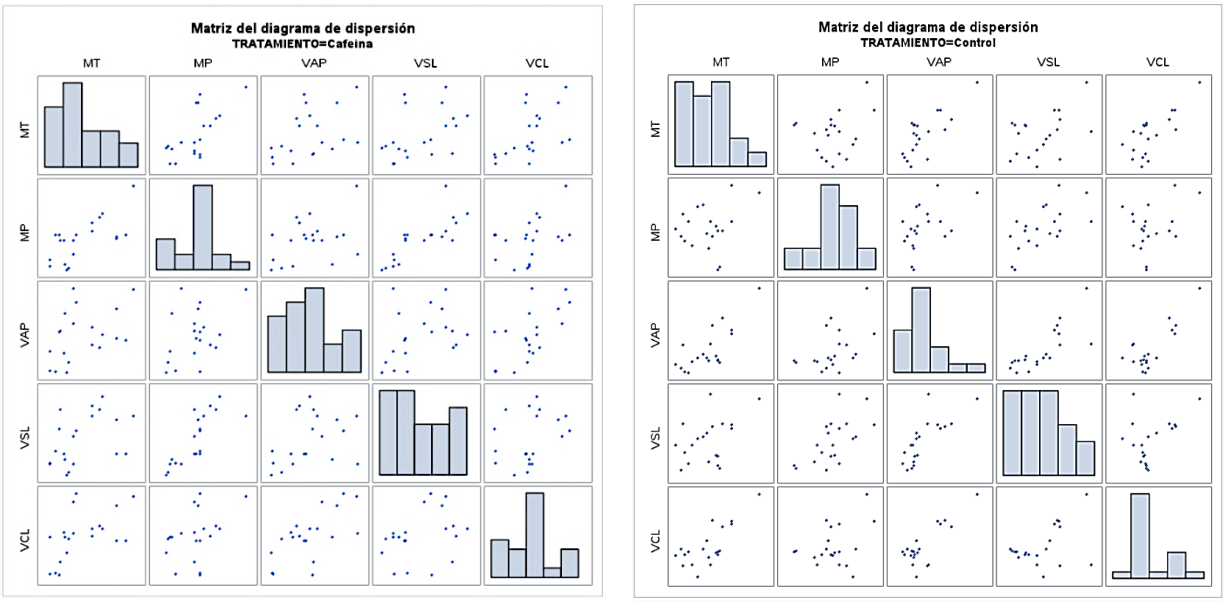
Capitulo IV

Resultados

A continuación, se encuentra el análisis descriptivo de la distribución para las variables de calidad seminal por tratamiento. Los histogramas en la diagonal muestran la distribución de cada variable, mientras que los gráficos de dispersión en las demás celdas permiten identificar tendencias o correlaciones entre pares de variables (Figura 3, 4, 5, 6).

Figura 3

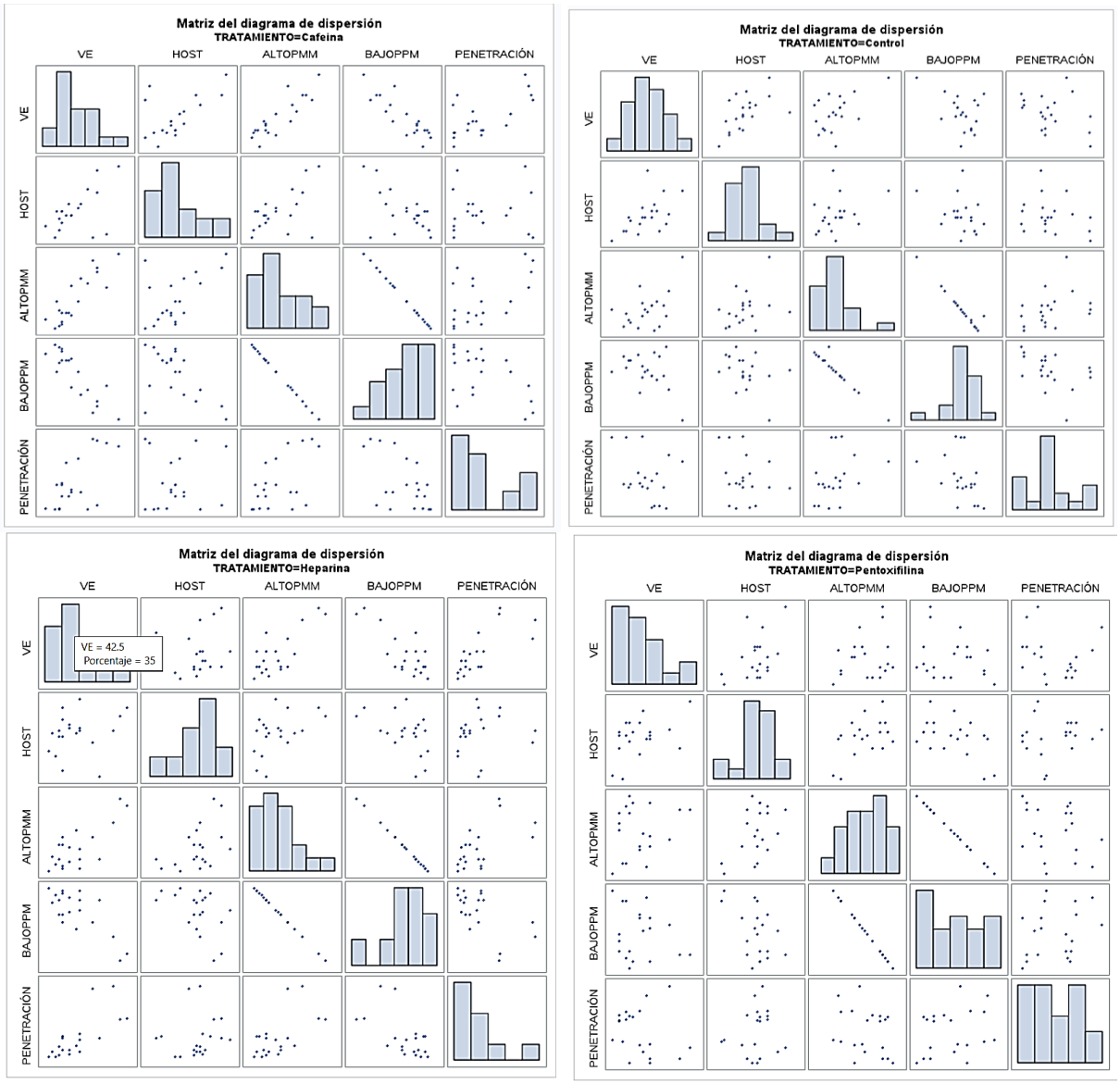
Matriz de diagramas de dispersión con las variables MT, MP, VAP, VSL, VCL. Correspondiente al tratamiento de cafeína y control.



Nota. Se presenta la relación entre las variables movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad promedio de trayecto (VAP), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad curvilínea (VCL) en los tratamientos con cafeína y control. *Fuente*: Madero, 2025.

Figura 4

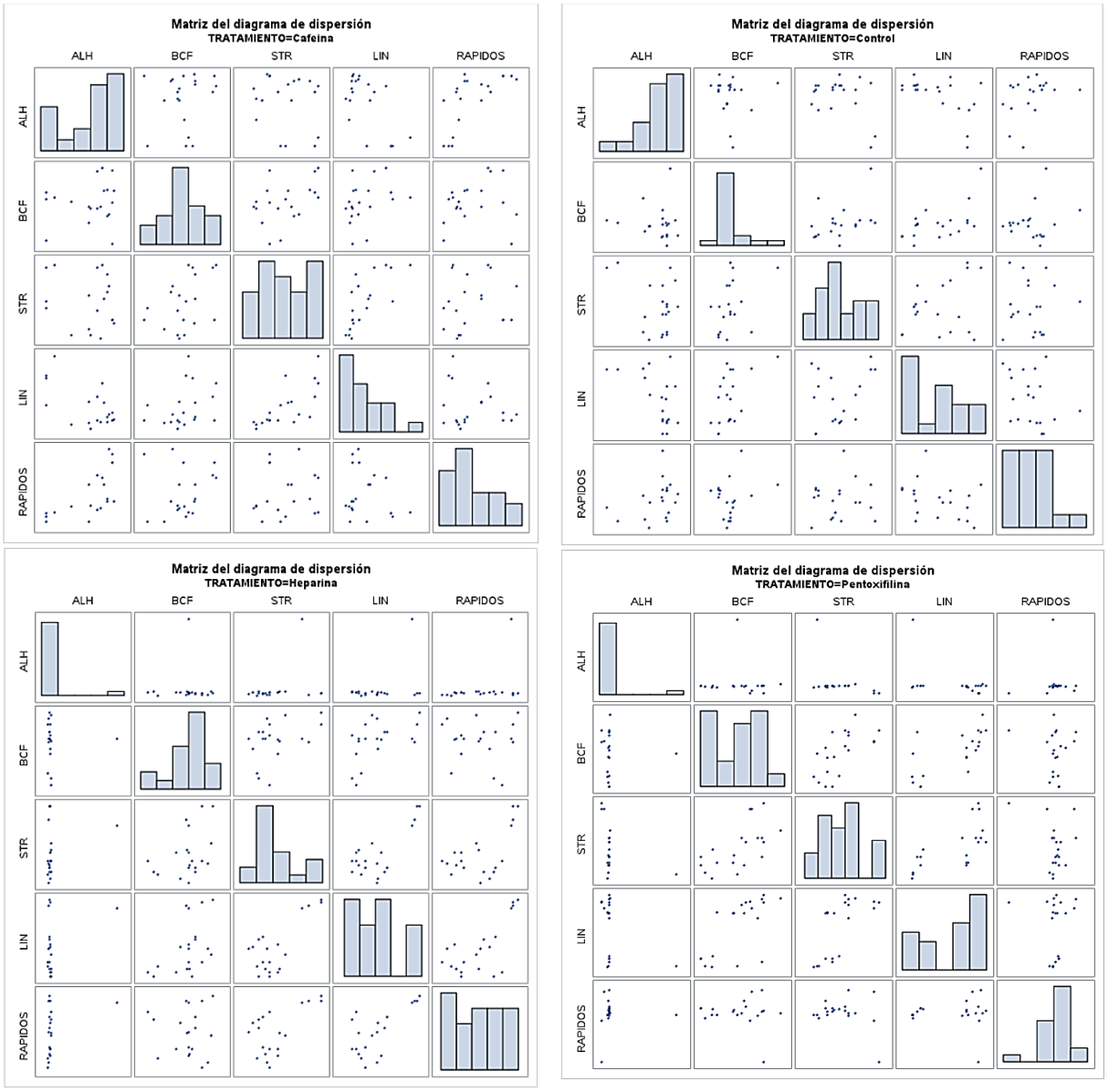
Matriz de diagramas de dispersión con las variables VE, HOST, PMM Y PM en los diferentes tratamientos.



Nota. Se presenta la relación entre las variables viabilidad espermática (VE), integridad de membrana plasmática (HOST), porcentaje de espermatozoides con alta y baja integridad de membrana (ALTOPMM y BAJOPPM) y (PM), penetración de la mucosidad. Evaluadas en los tratamientos con cafeína, control, heparina y pentoxifilina. *Fuente*: Madero, 2025.

Figura 5

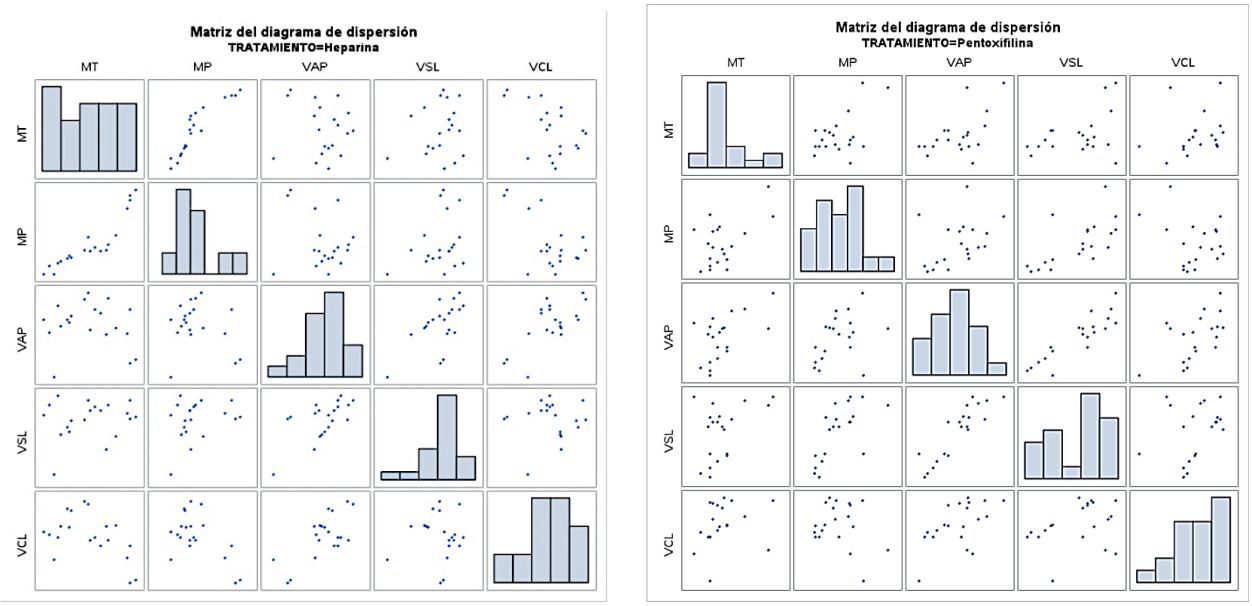
Matriz de diagramas de dispersión con las variables ALH, BCF, STR, LIN, RAPIDOS en los diferentes tratamientos.



Nota. Se presenta la relación entre las variables amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido de la cola (BCF), rectitud (STR), linealidad (LIN) y porcentaje de espermatozoides rápidos, en semen equino postdescongelación, evaluadas bajo tratamientos con cafeína, control, heparina y pentoxifilina. *Fuente*: Madero, 2025.

Figura 6

Matriz de diagramas de dispersión con las variables MT, MP, VAP, VSL, VCL. Correspondiente al tratamiento de heparina y pentoxifilina.



Nota. Se presenta la relación entre las variables movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad promedio de trayecto (VAP), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad curvilínea (VCL) en los tratamientos con heparina y pentoxifilina. *Fuente*: Madero, 2025.

Se logra observar el análisis descriptivo de los parámetros evaluados movilidad, cinética, vitalidad, integridad funcional, actividad de membrana mitocondrial, y penetración de la mucosidad correspondientes al semen equino post descongelado. Para ello, se descongelaron dos pajillas por tratamiento en baño maría a 37 °C por 1 minuto (Tabla 1).

Tabla 1

Análisis descriptivo del semen equino post descongelación

Variable	n	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Coeficiente de Variación	Límite de confianza inferior (95%)	Límite de confianza superior (95%)
MT	80	63,81	17,56	1,96	27,52	59,90	67,72
MP	80	36,08	15,30	1,71	42,42	32,67	39,48
VAP	80	49,70	10,32	1,15	20,77	47,41	52,00
VSL	80	37,94	10,26	1,15	27,03	35,66	40,22
VCL	80	99,37	22,76	2,54	22,91	94,31	104,4
ALH	80	6,81	7,80	0,87	114,64	5,07	8,54
BCF	80	28,11	5,63	0,63	20,04	26,86	29,36
STR	80	70,18	10,24	1,15	14,60	67,90	72,45
LIN	80	48,99	20,04	2,24	40,90	44,53	53,45
VE	80	46,11	8,40	0,94	18,21	44,24	47,98
HOST	80	39,88	6,23	0,70	15,62	38,49	41,26
RAPIDOS	80	62,88	18,25	2,04	29,02	58,82	66,94
A PMM	80	47,15	8,79	0,98	18,64	45,19	49,11
B PMM	80	52,99	8,90	0,99	16,79	51,01	54,97
PM	80	10,12	8,32	0,93	82,23	8,27	11,97

Nota. La tabla presenta el análisis descriptivo de los parámetros evaluados en el semen equino posdescongelación. Las variables analizadas fueron: MT (motilidad total), MP (motilidad progresiva), VAP (velocidad promedio de trayectoria), VSL (velocidad en línea recta), VCL (velocidad en trayectoria curvilínea), ALH (amplitud lateral de la cabeza), BCF (frecuencia de batida de la cabeza), STR (índice de rectitud), LIN (índice de linealidad), VE (vitalidad espermática), HOST (integridad funcional de la membrana plasmática), RAPIDOS (porcentaje de espermatozoides rápidos), A PMM y B PMM (potencial de membrana mitocondrial tipo Alto y tipo Bajo, respectivamente), y PM (capacidad de penetración en mucosidad).

Tabla 2

Análisis post descongelación por tratamiento del semen equino

Variable	TRATAMIENTO			
	Control	**Cafeína**	**Heparina**	**Pentoxifilina**
MT	67,75 ± 2,54 (62,43 - 73,07)	53,75 ± 3,74 (45,91 - 61,59) **	59,70 ± 3,74 (48,75 - 70,65)	74,05 ± 1,93 (70,02 - 78,08)
MP	37,25 ± 1,99 (33,09 - 41,41)	25,60 ± 2,38 (20,63 - 30,57) *	34,50 ± 2,38 (26,19 - 42,81)	46,95 ± 3,34 (39,97 - 53,93)
VAP	49,15 ± 2,73 (43,43 - 54,87)	43,53 ± 1,58 (40,23 - 46,83)	52,08 ± 1,58 (49,51 - 54,65)	54,06 ± 2,72 (48,37 - 59,75)
VSL	36,63 ± 2,31 (31,80 - 41,46)	32,09 ± 2,07 (27,75 - 36,42)	40,59 ± 2,07 (38,32 - 42,86)	42,45 ± 2,78 (36,62 - 48,28)
VCL	101,74 ± 5,67 (89,87 - 113,60)	93,32 ± 4,27 (84,38 - 102,25)	99,88 ± 4,27 (88,85 - 110,91)	102,56 ± 5,18 (91,73 - 113,39)
ALH	5,92 ± 0,29 (5,32 - 6,52)	4,98 ± 0,33 (4,30 - 5,66)	8,10 ± 0,33 (2,99 - 13,20)	8,23 ± 2,47 (3,05 - 13,40)
BCF	27,60 ± 1,93 (23,56 - 31,64)	27,54 ± 0,80 (25,85 - 29,22)	28,24 ± 0,80 (26,68 - 29,80)	29,07 ± 1,26 (26,42 - 31,71)
STR	67,85 ± 2,15 (63,34 - 72,36)	66,65 ± 1,84 (62,80 - 70,50)	73,15 ± 1,84 (68,27 - 78,03)	73,05 ± 2,56 (67,70 - 78,40)
LIN	46,45 ± 3,41 (39,31 - 53,59)	39,45 ± 3,45 (32,23 - 46,67)	49,30 ± 3,45 (41,21 - 57,39)	60,75 ± 5,71 (48,80 - 72,70)
VE	46,70 ± 1,64 (43,26 - 50,14)	40,55 ± 1,84 (36,70 - 44,40) **	44,15 ± 1,84 (41,00 - 47,30)	53,05 ± 1,39 (50,14 - 55,96) **
HOST	40,65 ± 1,12 (38,30 - 43,00)	37,10 ± 1,18 (34,64 - 39,56)	38,20 ± 1,18 (34,99 - 41,41)	43,55 ± 1,33 (40,76 - 46,34)
RAPIDOS	66,87 ± 2,43 (61,78 - 71,96)	53,70 ± 3,72 (45,91 - 61,49)	59,55 ± 3,72 (48,55 - 70,55)	71,40 ± 3,49 (64,09 - 78,70)
ALTOPMM	48,15 ± 1,82 (44,34 - 51,96)	43,15 ± 2,30 (38,33 - 47,97)	47,75 ± 2,30 (43,77 - 51,73)	49,55 ± 1,61 (46,17 - 52,93)
BAJOPMM	52,40 ± 1,94 (48,35 - 56,45)	56,85 ± 2,30 (52,03 - 61,67)	52,25 ± 2,30 (48,27 - 56,23)	50,45 ± 1,61 (47,07 - 53,83)
PENETRACIÓN	13,12 ± 2,07 (8,79 - 17,46)	5,48 ± 1,13 (3,11 - 7,85)	8,73 ± 1,13 (5,04 - 12,41)	13,14 ± 1,88 (9,21 - 17,07)

Nota. La tabla muestra el análisis postdescongelación de los parámetros espermáticos del semen equino según el tratamiento aplicado: control, cafeína, heparina y pentoxifilina. Los resultados se expresan como media ± error estándar, seguidos del intervalo de confianza al 95 %. Las variables evaluadas fueron: MT (movilidad total), MP (movilidad progresiva), VAP (velocidad promedio de trayectoria), VSL (velocidad en línea recta), VCL (velocidad en trayectoria curvilínea), ALH (amplitud lateral de la cabeza), BCF (frecuencia de batida de la cola), STR (índice de rectitud), LIN (índice de linealidad), VE (vitalidad espermática), HOST (integridad funcional de la membrana plasmática), RAPIDOS (porcentaje de espermatozoides rápidos), ALTOPMM y BAJOPPM (potencial de membrana mitocondrial alto y bajo), respectivamente. Además de la PENETRACIÓN (capacidad de penetración en mucosidad).

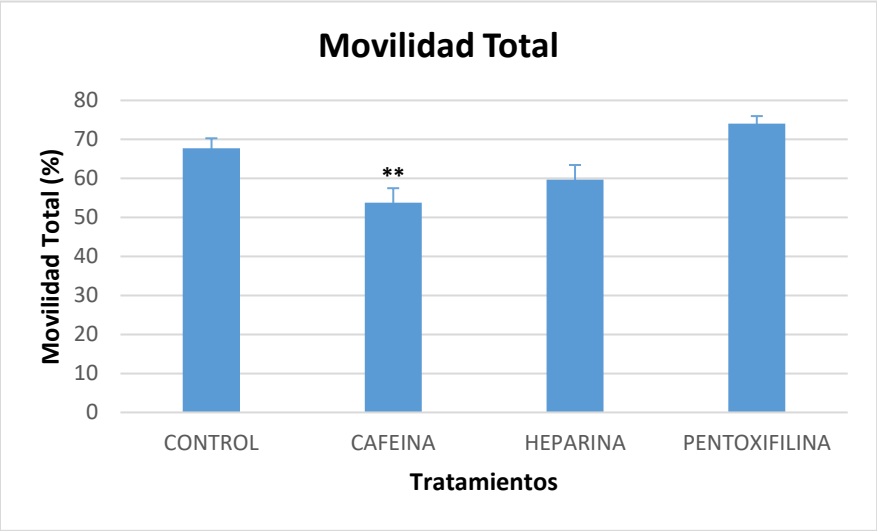
* Y ** indican diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$; $p < 0.01$).

La evaluación detallada de los parámetros espermáticos postdescongelación reveló que la cafeína genero una disminución en variables como MT, MP y VE, respecto al control. Por el contrario, la pentoxifilina incrementó el porcentaje de espermatozoides viables vs el control ($p < 0.01$). Adicionalmente, parámetros como VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, HOST, RAPIDOS, PMM y PENETRACIÓN, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Tabla 2).

A continuación, se muestra las gráficas donde se expresa las medias de los parámetros evaluados que presentaron significancia respecto al control (Figuras 7,8 y 9). * Y ** indican diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$; $p < 0.01$).

Figura 7

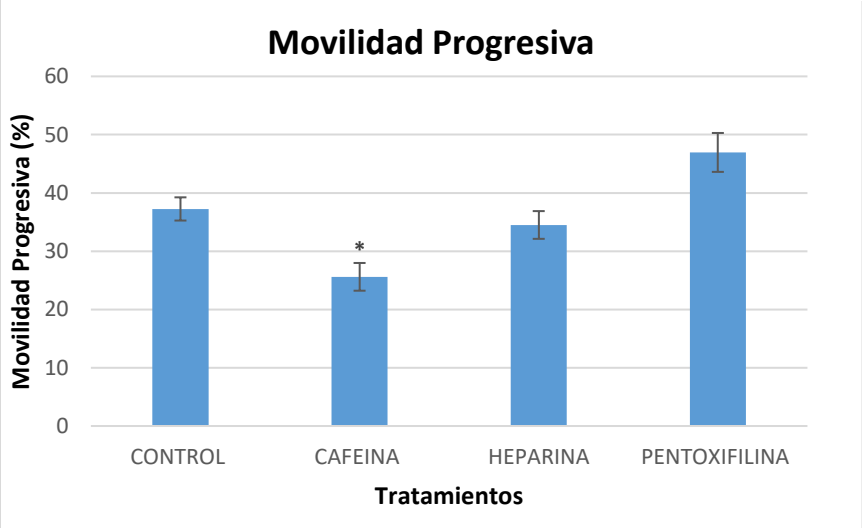
Efecto de diferentes tratamientos sobre la movilidad total espermática (%).



Nota. Los datos están expresados ± error estándar de la media (n = 20). $p < 0.01$ indica diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control. *Fuente:* Madero, 2025.

Figura 8

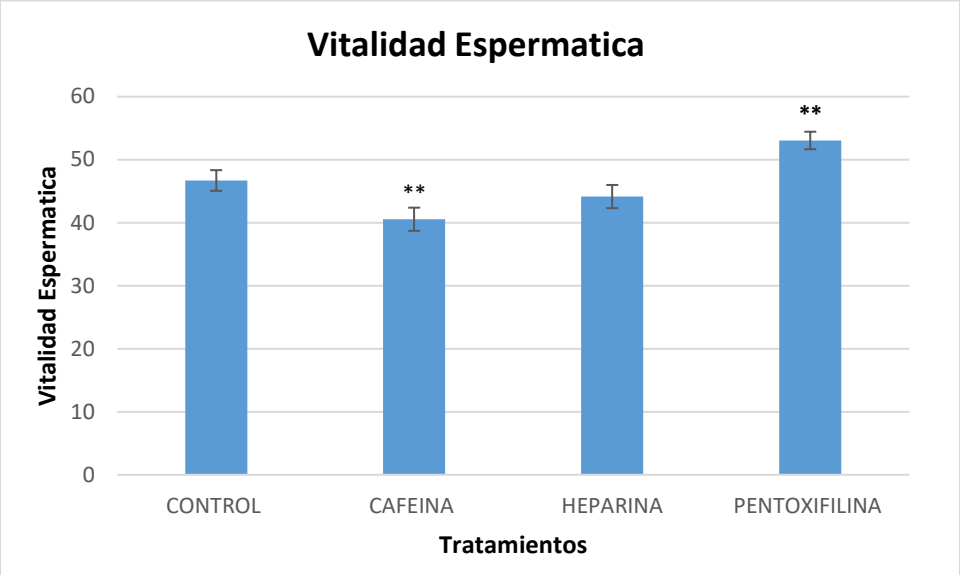
Efecto de diferentes tratamientos sobre la movilidad progresiva espermática (%).



Nota. Los datos están expresados ± error estándar de la media (n = 20). $p < 0.05$ indica diferencia estadísticamente significativa de cafeína respecto al control. *Fuente:* Madero, 2025.

Figura 9

Efecto de diferentes tratamientos sobre la vitalidad espermática (%).



Nota. Los datos están expresados ± error estándar de la media (n = 20). $p < 0.01$ indica diferencia estadísticamente significativa de cafeína y pentoxifilina respecto al control. *Fuente:* Madero, 2025.

En la (figura 10). Se presentan los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la variable penetración y los parámetros espermáticos cinéticos y funcionales, para los tratamientos de cafeína, control, heparina y pentoxifilina, respectivamente.

Figura 10

Correlación entre las variables de calidad seminal y la prueba de penetración de la mucosidad con cafeína, control, heparina y pentoxifilina, respectivamente.

A

Coeficientes de correlación Pearson, N = 20
Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	VE	HOST	RAPIDOS	ALTOPMM	BAJOPPM
PENETRACIÓN	0.64913	0.43293	0.41443	0.12984	0.48762	0.48765	-0.13662	-0.02427	-0.23747	0.64811	0.05161	0.64765	0.54408	-0.54408
PENETRACIÓN	0.0020	0.0566	0.0693	0.5853	0.0292	0.0292	0.5657	0.9191	0.3134	0.0020	0.8289	0.0020	0.0131	0.0131

B

Coeficientes de correlación Pearson, N = 20
Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	VE	HOST	RAPIDOS	ALTOPMM	BAJOPPM
PENETRACIÓN	0.40570	0.30335	0.40855	0.37053	0.16678	0.13020	0.02948	0.31697	-0.25557	-0.31515	-0.23514	0.36682	0.35874	-0.42005
PENETRACIÓN	0.0759	0.1936	0.0737	0.1078	0.4822	0.5843	0.9018	0.1733	0.2768	0.1759	0.3183	0.1116	0.1204	0.0652

C

Coeficientes de correlación Pearson, N = 20
Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	VE	HOST	RAPIDOS	ALTOPMM	BAJOPPM
PENETRACIÓN	0.61090	0.56043	0.12558	0.09530	-0.01903	0.59011	-0.12293	0.47180	0.35222	0.73261	0.14078	0.60750	0.58997	-0.58997
PENETRACIÓN	0.0042	0.0102	0.5978	0.6894	0.9365	0.0062	0.6056	0.0357	0.1278	0.0002	0.5538	0.0045	0.0062	0.0062

D

Coeficientes de correlación Pearson, N = 20
Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	VE	HOST	RAPIDOS	ALTOPMM	BAJOPPM
PENETRACIÓN	-0.01512	-0.11075	-0.16222	-0.14052	-0.38726	0.02949	-0.35782	0.09135	-0.32370	-0.20296	0.13780	0.07250	-0.25531	0.25531
PENETRACIÓN	0.9495	0.6420	0.4944	0.5546	0.0916	0.9018	0.1214	0.7017	0.1639	0.3908	0.5623	0.7613	0.2773	0.2773

Nota. Se presentan los coeficientes de correlación de Pearson (r) y los valores de significancia (p) entre la variable de penetración y las variables MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, VE, HOST, porcentaje de espermatozoides rápidos, ALTOPMM y con baja integridad de membrana BAJOPPM, para los tratamientos con Cafeína (A), Control (B), Heparina (C), Pentoxifilina (D). *Fuente:* Madero, 2025.

En el análisis de correlación de la variable penetración de la mucosidad correspondiente al tratamiento cafeína, se encontró una asociación significativa ($p < 0.05$) con las variables, MT, VCL, ALH, VE, RAPIDOS, ALTO PMM, BAJO PMM. Evidenciando una correlación positiva

de la penetración de la mucosidad con las variables mencionadas con anterioridad a excepción de BAJO PMM. Con un coeficiente de correlación negativa de (-0.54).

En este mismo tratamiento no se obtuvo correlación significativa entre penetración de la mucosidad y las variables VAP, VSL, BCF, STR, LIN Y HOST ($p > 0.05$).

El análisis de correlación de la variable penetración de la mucosidad en el tratamiento con heparina reveló una asociación significativa ($p < 0.05$) con las variables MT, MP, ALH, STR, VE, RÁPIDOS, ALTO PMM y BAJO PMM. Estos resultados indican una correlación positiva entre la penetración de la mucosidad y todas las variables mencionadas, excepto con BAJO PMM. (-0.58).

En este mismo tratamiento, no se encontró una correlación significativa entre la penetración de la mucosidad y las variables VAP, VSL, VCL, BCF, LIN y HOST ($p > 0.05$).

En los tratamientos control y pentoxifilina no se encontraron correlaciones significativas entre la penetración de la mucosidad y las variables evaluadas.

Discusión

La criopreservación de los espermatozoides resulta beneficiosa para realizar inseminaciones artificiales en el momento en que se estima que la ovulación está próxima, sin embargo, esta biotecnología genera alteraciones que reducen la calidad espermática (Restrepo, B, y col., 2016). En el presente estudio se evaluó el efecto de tres moléculas: cafeína, heparina y pentoxifilina, las cuales fueron suplementadas en el medio de congelación del semen equino, observando su impacto en diversos parámetros espermáticos tras el proceso de criopreservación y descongelación. De manera destacada, el tratamiento con pentoxifilina (PTX) mostró una mejora significativa en la vitalidad espermática (VE), coincidiendo con lo reportado por (Ghasemzadeh, A, y col., 2016), donde el uso de concentraciones estimadas a 200 ug /ml aumento significativamente la tasa de este parámetro en espermatozoides de hombres infértiles, cuyo efecto puede ser explicado por la capacidad antioxidante de esta molécula y su efecto en la eliminación de radicales libres (Esteves, S, y col., 2007).

Por el contrario, en la presente investigación, la adición de pentoxifilina (PTX) no mostro ningún efecto sobre movilidad y cinética espermática, diferente a lo reportado por (Guasti, P, y col., 2013), donde la adición de pentoxifilina (PTX) al semen recuperado de epidídimo mejoro la movilidad total (MT) y movilidad progresiva (MP) en semen descongelado. De manera similar, también difiere de lo reportado por (Restrepo, B, y col., 2016), donde la pentoxifilina (PTX) no mejoró estos parámetros, a pesar de ser descrito como activador de la movilidad espermática por su efecto inhibidor de la fosfodiesterasa del grupo de las metilxantinas.

Respecto a la heparina (HEP), su adición a una concentración de 10 ug/ml en el medio de congelación al semen equino no genero ningún efecto significativo sobre los parámetros evaluados en comparación al control, lo cual coincide con lo descrito por (Mendoza, A., 2023), donde no se apreciaron diferencias con la suplementación de esta molécula en variables como movilidad total (MT) y movilidad progresiva (MP).

En definitiva, la adición de heparina no genero ningún cambio en el presente trabajo, aun cuando existen estudios que confirman que la heparina es capaz de generar un aumento significativo en la movilidad espermática de semen de carnero, congelados- descongelados, mejorando la capacidad fertilizante al inducir una mayor captación de calcio, un mayor calcio libre intracelular y una menor concentración de calmodulina (El-Shahat, K, y col., 2016).

Por otro lado, en el presente estudio se observó que la adición de cafeína al diluyente de congelación del semen equino provocó una disminución significativa en la movilidad total (MT) y la movilidad progresiva (MP) en comparación con el grupo control ($p < 0.01$ y $p < 0.05$). Este resultado difiere de lo reportado en estudios previos, como él de (Alves, N, y col., 2021), donde la adición de cafeína a una concentración de 5 mM mejoró significativamente la movilidad espermática. A pesar de utilizar la misma concentración de cafeína en la presente investigación los resultados no fueron los mismo, lo que indica que esta molécula la puede influir notablemente sobre la calidad espermática.

Además, en el presente estudio se encontró que la cafeína tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad espermática (VE). Este resultado puede ser explicado por la concentración utilizada de esta molécula teniendo en cuenta que la adición de cafeína en dosis elevadas e incluso en muestras sometidas a procesos como la criopreservación puede favorecer la formación

de especies reactivas de oxígeno comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides y disminuyendo la capacidad fertilizante (Pariz, J, y col., 2019).

Cabe mencionar la importancia de suplementar concentraciones adecuadas de esta molécula teniendo en cuenta que existen estudios donde su adición si ha permitido mejorar la viabilidad espermática y prevenir el daño oxidativo en tejidos testiculares y epididimarios de ratas (Akomolafe, S, y col., 2019). Estos autores también reportan que el efecto de esta molécula puede estar relacionado a las especies evaluadas, las condiciones del experimento o al momento de exposición de las muestras a la cafeína, resaltando su acción compleja sobre la fisiología espermática. Siendo importante entender a la cafeína como una molécula que permite mejorar parámetros de movilidad al inhibir la enzima fosfodiesterasa, aumentar el AMP cíclico (AMPc) intracelular, y activar de esta manera, proteínas reguladoras de la movilidad y progresividad espermática como la PKA (Tremellen, K., 2008).

Como conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que la adición de ciertas moléculas al medio de congelación puede tener efectos que difieren sobre los parámetros espermáticos del semen equino posdescongelación; resumidamente, la pentoxifilina mostró un efecto positivo sobre la viabilidad espermática del semen equino descongelado, mientras que la cafeína y la heparina no generaron mejoras significativas en los parámetros evaluados. Estos resultados evidencian que el efecto de los aditivos crioprotectores depende de múltiples factores, como la concentración, el momento de aplicación y la especie, por lo que se requieren estudios adicionales para optimizar su uso en programas de criopreservación equina en el diluyente de congelación.

Capítulo V

Conclusiones

La adición de pentoxilina (PTX) al medio de congelación en el semen equino tiene la capacidad de aumentar significativamente la viabilidad espermática (VE) sin generar cambios en la movilidad, efecto asociado posiblemente a su acción antioxidante.

La suplementación de cafeína al medio de congelación en el semen equino redujo significativamente la movilidad total (MT) y movilidad progresiva (MP) y la vitalidad espermática (VE), explicado posiblemente por una elevada concentración de esta molécula o el favorecimiento en la producción de especies reactivas de oxígeno debido al proceso de criopreservación.

No se presentaron cambios significativos en las variables evaluadas como consecuencia de la adición de heparina en el medio de congelación en el semen equino, sugiriendo que su efecto depende de la especie, concentración y protocolo utilizado.

Aunque la criopreservación puede generar daños en el semen equino, se pueden encontrar moléculas cuya adición al medio de congelación permita mitigar las alteraciones que reduzcan la capacidad fertilizante.

Recomendaciones

Probar otras concentraciones que permitan determinar la dosis adecuada evitando generar daños o alteraciones como consecuencia de la adición de estas moléculas como en el caso de la cafeína.

Realizar evaluaciones complementarias que permitan determinar el efecto de estas moléculas sobre la capacidad fecundante de espermatozoides equinos congelados.

Se recomienda no incluir sementales que estén cursando posiblemente con una afección patológica en su tracto reproductor que pueda influir en resultados negativos frente a las muestras seminales.

Continuar con investigaciones que optimicen la suplementación del diluyente de congelación y contribuyan al perfeccionamiento de los protocolos de criopreservación en equinos.

Referencias Bibliográficas

Abril Galvis, K. (2023). *Importancia De Los Diluyentes Para La Conservación Y Preservación En Semen Equino.* [Universidad Antonio Nariño]. http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/9449.

Abril Galvis, K. T. (2024). Importancia de los diluyentes para la conservación y preservación en semen equino.

Akomolafe, S. F., Olasehinde, T. A., Ogunsuyi, O. B., Oyeleye, S. I., & Oboh, G. (2019). Caffeine improves sperm quality, modulates steroidogenic enzyme activities, restore testosterone levels and prevent oxidative damage in testicular and epididymal tissues of scopolamine-induced rat model of amnesia. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *71*(10), 1565-1575.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramírez Neto, C. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, *89*(1-4), 105-113.

Alves, N. D. C., Diniz, S. D. A., Viegas, R. N., Cortes, S. F., Costa, E. D., Freitas, M. M., ... & Lagares, M. D. A. (2021). Addition of caffeine to equine thawed sperm increases motility and decreases nitrite concentration. *Andrologia*, *53*(2), e13918.

Arenas, E., Cambrón, A., Ambriz, D., Zúñiga, P., Rodríguez, A., & Rosado, A. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. Contactos, 78, 5–11.

Basioura, A., Boscos, C. M., Parrilla, I., Tsousis, G., & Tsakmakidis, I. A. (2018). Effect of astaxanthin on the quality of boar sperm stored at 17°C, incubated at 37°C or under in vitro conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 463–471. https://doi.org/10.1111/RDA.13133.

Benjamín Alberto Rojano, G. R. B. E. P. L. (2013). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista De Investigación*, *9*(1). https://revistas.unilasallista.edu.co/index.php/rldi/article/view/303

Canisso, I., Souza, F., Silva, E., Martínez, M., & Lima, A. L. (2008). Yema de huevo y LDL: potencialidades para la inseminación artificial en equinos. *Revista MVZ Córdoba*, *13*(3), 1514-1521.

Chagüeza, S., & Felipe, L. (2024). Evaluación de la calidad seminal en equinos de raza criollo colombiano con tres diluyentes comerciales.

Chamba-Ochoa, H., Benítez, E., Jiménez, L., Castillo, F., & Vidal, P. (2017). Inseminación artificial a tiempo fijo en asnas utilizando semen equino fresco y refrigerado. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *18*(10), 1-10.

Consuegra, C. (2019). Vitrificación de esperma de caballo empleando crioprotectores no penetrantes.

Contreras, M. J., Treulen, F., Arias, M. E., Silva, M., Fuentes, F., Cabrera, P., & Felmer, R. (2020). Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*(2), 229-239.

CRUZ, J. A. C., & JARAMILLO, L. C. (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática. *Conexión Agropecuaria JDC*, *6*(1), 45-64.

Devireddy, R. V., Swanlund, D. J., Olin, T., Vincente, W., Troedsson, M. H. T., Bischof, J. C., & Roberts, K. P. (2002). Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biology of reproduction*, *66*(1), 222-231.

Duque, J. E., Rojano, B. A., & Restrepo, G. (2017). Criotolerancia de semen equino congelado con aditivos en el diluyente. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *28*(1), 120-129.

El-Shahat, K. H., Taysser, M. I., Badr, M. R., & Zaki, K. A. (2016). Effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction of fresh ram spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, *5*(2), 148-155.

EQUINO, C. S. (2020). Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino. *InVet*, *22*(1), 41-49.

Esteves, S. C., Spaine, D. M., & Cedenho, A. P. (2007). Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. Brazilian Journal of 55 Medical and Biological Research, 40(7), 985–992. https://doi.org/10.1590/S0100 879X2006005000118.

Gamboa, S., Rodrigues, A. S., Henriques, L., Batista, C., & Ramalho-Santos, J. (2010). Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*, *73*(7), 950–958. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.023.

Ghasemzadeh, A., Karkon-Shayan, F., Yousefzadeh, S., Naghavi-Behzad, M., & Hamdi, K. (2016). Study of pentoxifylline effects on motility and viability of spermatozoa from infertile asthenozoospermic males. Nigerian Medical Journal, 57(6), 324. https://doi.org/10.4103/0300-1652.193857.

Giraldo, N., Villegas, J. E. C., & Araque, N. V. (2006). Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, *1*(2), 8-16.

Gradil, C. M., & Ball, B. A. (2000). The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, *54*(7), 1041-1047.

Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Maziero, R. R. D., Carmo, M. T., Dell'Aqua, J. A., Crespilho, A. M., Rifai, E. A., & Papa, F. O. (2017). Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. Animal Reproduction Science, 179, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.013

Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Maziero, R. R., Martin, I., Avanzi, B. R., Dellaqua Jr, J. A., & Papa, F. O. (2013). Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(12), 1153-1156.

Guo, H., Gong, Y., He, B., & Zhao, R. (2017). Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology*, 87, 276–283. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.005.

Jiménez de la Fuente, A. (2018). Efectos de las terapias ecuestres en personas con parálisis cerebral.

Luzko, N. C. R., Stornelli, M. A., & Miragaya, M. H. (2021). OPTIMIZANDO PROTOCOLOS PARA MEJORAR EL BIENESTAR ANIMAL MEDIANTE LA CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO. *Ciencias de la Salud*, *3*(1), 1-8.

Luzko, N. R., Azcurra, M., Benitez, N. B., Miragaya, M., & Stornelli, M. A. (2018). Criopreservación seminal en equinos: Efecto de la Trehalosa sobre la célula espermática. *ScientiAmericana*, *5*(1).

McDonnell, S. (1986). Reproductive behavior of the stallion. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, *2*(3), 535-555.

Mesa, A. M., Sc, M., R, G. H., & Sc, M. (2012). *Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos Effect of cholesterol and dimethiyl-formamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm*. *17*(1), 2908–2915.

Mihók, Z. S., & Montijano, R. C. (2016). El sector ecuestre y la economía. *Archivos de zootecnia*, *65*(252), 481-488.

MISAS, P. (1991). La inseminación artificial en la especie equina. *MUNDO GANADERO*, *9*, 25.

Montalvo Illescas, M. A., & Aguirre Riofrío, E. L. (2019). Estudio de la conducta sexual y calidad seminal en fresco en 3 grupos raciales en equinos.

Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, *63*(9), 2372-2381.

Muñiz, D. C. M. (2010). El caballo en la Edad Media. Un estado de la cuestión. *Homenaje al profesor Eloy Benito Ruano*, 537-552.

Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., & Agüero, A. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32(6), 351–355. https://doi.org/10.1046/J.1439-0272.2000.00357.X.

Olguín, O., & VR, E. (2008). Manual de inseminación artificial para la operatividad de semen congelado en yeguas (Equss caballus) del criadero militar de ganado Santa Gertrudis Chihuahua. *Obtenido de https://zootecnia. Chapingo. Mx/assets/11olguin. Pdf*.

Palomino Guerrera, W. (2019). Efecto de la suplementación de dos agentes Capacitantes en el medio de fertilización para la producción in vitro de embriones en alpacas (Vicugna pacos) a 2750 msnm-Ayacucho 2017.

Pariz, J. R., Ranéa, C., Monteiro, R. A., Evenson, D. P., Drevet, J. R., & Hallak, J. (2019). Melatonin and caffeine supplementation used, respectively, as protective and stimulating agents in the cryopreservation of human sperm improves survival, viability, and motility after thawing compared to traditional TEST-yolk buffer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*(1), 6472945.

Pérez, D. D., Acosta, M., Restrepo, G., Camacho, C., & Pérez, J. (2017). Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de dimetilformamida. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *28*(4), 918-927.

Remezovski Luzko N, Azcurra M, Benitez NB, Miragaya M, Stornelli MA. Criopreservación seminal en equinos: Efecto de la Trehalosa sobre la célula espermática. Sci. Am.

[Internet]. 23 de abril de 2018 [citado 6 de mayo de 2025]; 5(1). Disponible en: https://revistacientifica.sudamericana.edu.py/index.php/scientiamericana/article/view/74

Restrepo Betancur, G., & Rojano, B. A. (2017). Efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante de semen equino diluido con fines de congelación. *Revista de Medicina Veterinaria*, (35), 149-158.

Restrepo Betancur, G., Duque Cortés, J. E., & Rojano, B. A. (2016). Efecto de la quercetina, la L-ergotioneina y la pentoxifilina en el semen equino posdescongelado. Revista de Salud Animal, 38(3), 154-163.

Restrepo Betancur, G., Pizarro López, E., & Alberto Rojano, B. (2012). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*, *9*(1), 128-136.

Restrepo Betancur, G., Usuga Suarez, A., Montoya Páez, J. D., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de investigación*, *11*(2), 63-70.

Restrepo Betancur, G., Usuga Suarez, A., Montoya Páez, J. D., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2013). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de investigación*, *11*(2), 63-70.

Risopatrón, J., Catalán, S., Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). Efecto de diferentes concentraciones de heparina sobre la capacitación espermática in vitro en canino. *Revista Científica*, *15*(6), 528-535.

Rota, A., Sabatini, C., Przybył, A., Ciaramelli, A., Panzani, D., & Camillo, F. (2019). Post-thaw addition of caffeine and/or pentoxifylline affect differently motility of horse and donkey-cryopreserved spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, *75*, 41-47.

Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of semen in domestic animals: A review of current challenges, applications, and prospective strategies. *Animals*, *12*(23), 3271.

Stern, C., & Chur-Hansen, A. (2019). An umbrella review of the evidence for equine-assisted interventions. *Australian Journal of Psychology*, *71*(4), 361-374.

Tandalla Tipanluisa, B. D. (2023). *Equinoterapia en niños con parálisis cerebral infantil* (Bachelor's thesis, Universidad Nocional de Chimborazo).

Tigse Vargas, Á. F. (2023). Evaluación de dos diluyentes Botucrio® e inra96 mediante Crioconservación de células espermáticas en caballos Lucitano y Arabe en el cantón Latacunga.

Trejos Soto, A. A., & Guzmán Ramos, E. (2009). Manejo reproductivo del semental equino.

Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update*, *14*(3), 243-258.

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* (Doctoral dissertation).

Usuga, A., Restrepo, G., & A Rojano, B. (2016). Criotolerancia del semen equino, estabilidad oxidativa y componentes del plasma seminal. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *27*(3), 505-517.

Valim, A. K. F., Correa, D. B., Muniz, I. M., & do Carmo Silva, F. (2024). Avaliação da viabilidade espermática do sêmen equino resfriado a 5ºc por 36 horas de garanhões alojados no município de Rolim de Moura–Rondônia-RO. *Research, Society and Development*, *13*(1), e2713144537-e2713144537.

Vargas Mendivil, S. A. (2013). Criopreservación de semen de caballo peruano de paso utilizando Glicerol, Etilenglicol, Dimetilsulfóxido y Dimetilacetamida como agentes Crioprotectores.

Varner, D. D., Bowen, J. A., & Johnson, L. (1993). Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. Archives of andrology, 31(3), 199-207.

Vázquez, L. (2016). *Cortejo y comportamiento reproductivo en equinos.* Academia. https://www.academia.edu/24789831/Cortejo_y_comportamiento_reproductivo_en_equinos?utm_source=chatgpt.com.

Anexos

Medellín, 13 de Mayo del 2025

Señores
COMITÉ TRABAJO DE GRADO
Medicina Veterinaria
Facultad Ciencias Agrarias

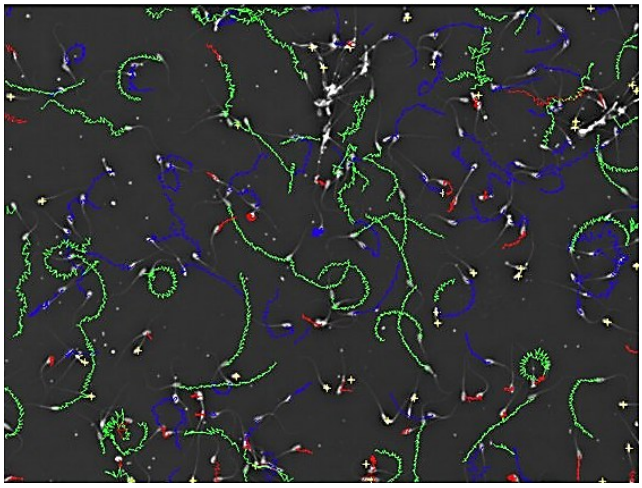
Por medio del presente **El coordinador del Laboratorio de Reproducción Animal** de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en la ciudad de Medellín, hace saber que el estudiante **Neider Madero Ovejero** con código **1.116.042.940**, del programa de Medicina Veterinaria de la Facultad Ciencias Agrarias, está cursando la pasantía en reproducción animal y durante su tiempo de práctica del **03 de Febrero al 31 de Mayo del 2025**, atendió el caso titulado. **"Efecto de la Cafeína, Pentoxifilina y Heparina en la criopreservación de semen equino"** además, de acompañar todos los procesos e investigaciones en el laboratorio.

Atentamente

Giovanni Restrepo Betancur
Coordinador
Laboratorio de Reproducción Animal

Anexo 1

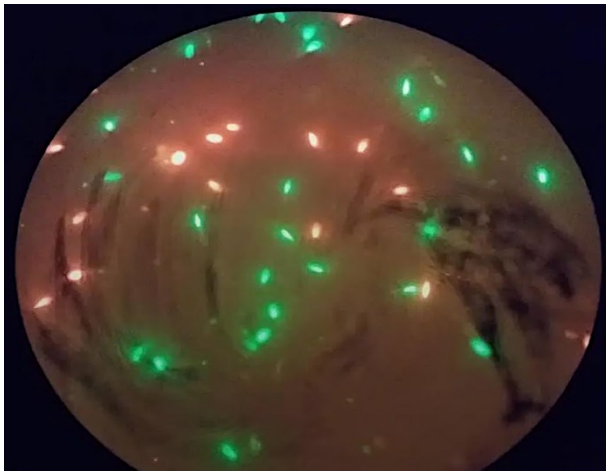
Movilidad y Cinética Espermática



Nota. Se muestran las subpoblaciones espermáticas, lo que permite un análisis detallado de las características de movilidad y concentración de cada una de ellas. *Fuente:* Madero, 2025.

Anexo 2

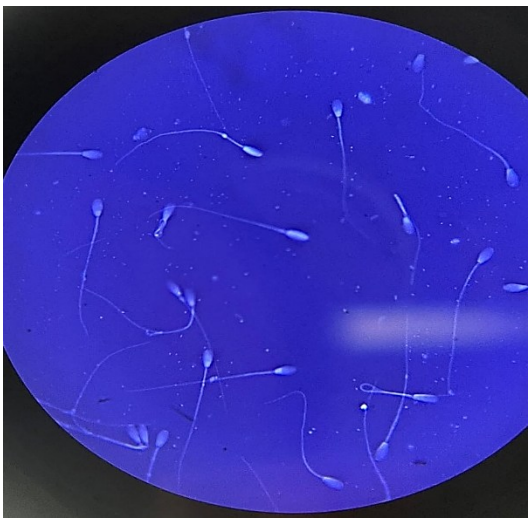
Integridad Estructural De La Membrana Plasmática (Vitalidad)



Nota. Se puede observar la diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos, representados en colores verde y rojo respectivamente, lo que permite evaluar la vitalidad espermática en la muestra. *Fuente:* Madero, 2025.

Anexo 3

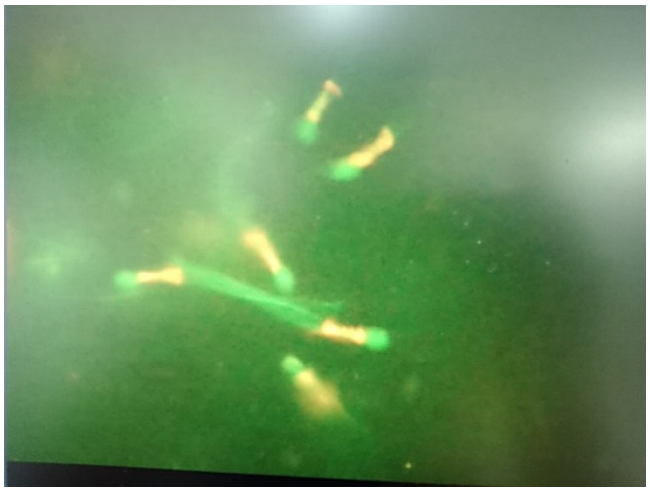
Integridad Funcional De La Membrana Plasmática (Host)



Nota. En la imagen se puede observar la presencia de espermatozoides con cola enrollada, resultado de la prueba hipoosmótica, la cual permite evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. *Fuente:* Madero, 2025.

Anexo 4

Actividad Mitocondrial



Nota. Se evidencia la tinción mitocondrial en los espermatozoides, lo cual indica un alto potencial de membrana mitocondrial. *Fuente:* Madero, 2025.