1. INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO:

Título: Impacto de la berberina y la metformina en el metabolismo y la conservación de semen de burro *(Equus asinus)*	
Línea Matriz de Investigación: (Manual de Líneas de Investigación): Línea matriz de investigación en ciencias Agrarias (LMI-AGR)	
Nombre de la Sede de ejecución del Proyecto: Sede central	
Nombre del(los) Objetivo(s) de Desarrollo(s) Sostenible: ODS15, Vida de ecosistemas terrestres	
Duración del Proyecto (en meses): 12	
Financiación	
Valor solicitado al Politécnico (en efectivo): $ 60.000.000	
Valor solicitado al Politécnico (en especie): $ 79.250.000	
Valor aprobado por otra entidad (en efectivo): $ 0	
Valor aprobado por otra entidad (en especie): $ 60.736.176	
Valor total del proyecto (efectivo + especie): $ 199.986.176	
Administrador del Presupuesto: Juan David Montoya Páez	C.C. 1020417714
Correo electrónico: jdmontoya@elpoli.edu.co	Teléfono:3122236520
Dirección de correspondencia: Cra 48 N°7-151, P19-118	
Nombre del Grupo de Investigación: Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA	
Equipo Investigador	
Investigador Principal: Juan David Montoya Páez	C.C. 1020417714
Correo electrónico: jdmontoya@elpoli.edu.co	Teléfono: 3122236520
Nombre de la Facultad: Ciencias Agrarias	
Tipo de Vinculación con la Institución: Docente Ocasional	
Nombre de la Sede: Sede central	
Dirección de correspondencia: Cra 48 N°7-151, P19-118	
Nombre del Grupo de Investigación: Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA	
Nombre del Semillero de Investigación:	
Conivestigador 1: Giovanni Restrepo Betancur	C.C. 98664281
Correo electrónico: grestre0@unal.edu.co	Teléfono:3162884882
Nombre de la Facultad: Ciencias Agrarias	
Tipo de Vinculación con la Institución: Docente de tiempo completo Universidad Nacional de Colombia	
Nombre de la Sede: Medellín	
Dirección de correspondencia: Cra 65 # 59A-110, Bl. 50, Of. 306	
Nombre del Grupo de Investigación: Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA	
Nombre del Semillero de Investigación: Semillero de Reproducción Animal (SER)	
Conivestigador 2: Alexandra Úsuga Suarez	C.C. 1017132099
Correo electrónico: alexandra.usuga@udea.edu.co	Teléfono: 3185990679
Nombre de la Facultad: Ciencias Agrarias	
Dirección de correspondencia: Calle 27 D sur # 27 C 51	
Tipo de Vinculación con la Institución: Docente tiempo completo Universidad de Antioquia	
Nombre de la Sede: Ciudadela Robledo, Medellín.	

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Nombre del Grupo de Investigación: Biogénesis			
Nombre del Semillero de Investigación:			
Asesor(si aplica):			
Estudiantes en Formación		Trabajo de pregrado*	
		Si	No
Estudiante 1: Yulitza Tatiana Peñuela Guzman	C.C. 1007288378		X
Correo electrónico: yulitza_penuela86192@elpoli.edu.co	Teléfono: 3112680647		
Nombre del Semillero de Investigación:	Facultad:		
Estudiante 2:	C.C.		
Correo electrónico:	Teléfono:		
Nombre del Semillero de Investigación:	Facultad:		
Estudiante 3: Correo electrónico:	C.C. Teléfono:		
Nombre del Semillero de Investigación:	Facultad:		

2. RESUMEN PROYECTO (*Máximo 250 palabras)*

Este proyecto se enmarca en el objetivo de desarrollo sostenible **número 15, Vida de ecosistemas terrestres**, que busca adoptar medidas urgentes y significativas para reducir la pérdida de la biodiversidad, proteger las especies amenazadas y evitar su extinción. Actualmente los burros (*Equus asinus*) se han catalogado como animales en riesgo de extinción en diferentes países. Una de las causas es el comercio ilegal indiscriminado de sus pieles hacia China, lo que ha conllevado a un descenso considerable de su población. La criopreservación de semen representa una herramienta para los procesos de conservación de las especies animales; sin embargo, ha mostrado bajos resultados en esta especie, siendo el estrés oxidativo uno de los principales responsables. El objetivo de esta investigación es evaluar el impacto de antioxidantes sobre la calidad y el metabolismo de semen descongelando de los burros. Se realizará la colecta, evaluación y criopreservación del semen de burros. El semen será suplementado con los antioxidantes berberina y metformina en diferentes concentraciones y un grupo control sin suplementación. Se realizarán pruebas de movilidad y cinética (sistema de análisis computarizado - CASA), funcionalidad de la membrana plasmática, viabilidad, apoptosis, metabolismo espermático (producción de ATP) y actividad mitocondrial mediante citometría de flujo. Para el análisis estadístico se realizará un modelo mixto y la comparación de medias por la prueba de Tukey. Con esta investigación se pretende buscar alternativas, como el uso de

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

antioxidantes, para mantener la viabilidad y la funcionalidad de los espermatozoides criopreservados de asnos, con el fin de promover su conservación.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (*Máximo 1.000 palabras)*

Actualmente las razas de burros se encuentran en grave peligro de extinción, pues se ha producido una disminución sustancial en el tamaño de la población y esto ha generado una disminución en la variabilidad genética de la especie (Bottrel et al., 2018). De las especies de interés agropecuario, el burro ha sido una de las especies más afectadas por la industrialización, la baja población en distritos rurales y la mecanización de la agricultura, lo cual ha llevado a la disminución de hasta el 80% de burros para el siglo XX (Rota et al., 2018). Sólo en Colombia se presentó una reducción cercana al 77% de la población de asnos entre el 2006 y el 2016 (FAO STAT, 2018). Mientras el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (2014), reportó que la población de burros criollos en el país era para el 2010 de 171.798 animales y para el año 2013 hubo una drástica reducción a 63.000 ejemplares. De igual forma la FAO (2014) indica que la mayoría de razas de burro en el mundo carecen de un censo de población y que además se encuentran en estado crítico o riesgo de extinción. En su último reporte del 2022, la FAO no posee cifras oficiales de la población de burros en el mundo, Sur América y aún menos para Colombia (FAO STAT, 2024).

Una de las consecuencias de la reducción de la población asnal, se ha dado por el comercio ilegal de pieles de burro hacia la China para la producción de un medicamento tradicional, causando a una reducción considerable en su población en países como Egipto, Mexico, Brasil, Etiopía, Kenia y Colombia (Revista Semana, 2017; The Donkey Sanctuary, 2017).

Durante el almacenamiento a bajas temperaturas, los espermatozoides equinos están sujetos al daño oxidativo de los fosfolípidos, las proteínas y la cromatina, también al estrés osmótico que conduce al daño de la membrana plasmática y la alteración en el metabolismo de los espermatozoides, sufriendo cambios similares a los de la apoptosis como

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

consecuencia de la congelación del semen (Ball, 2008). El estrés oxidativo es la respuesta a una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Ortega-Ferrusola et al., 2011); éstas pueden generarse como una parte típica del metabolismo oxidativo de las mitocondrias, como resultado de la pérdida de electrones del sistema de transporte de electrones (Ball et al., 2001).

Los espermatozoides equinos dependen principalmente de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), y menos del metabolismo glucolítico (Gibb et al., 2014; Plaza et al., 2015). La OXPHOS tiene las ventajas de producir rápidamente altos niveles de ATP y facilitar una mayor movilidad espermática que la glicólisis; sin embargo, genera alta cantidad de ERO, que se producen como un subproducto, siendo la mitocondria su principal sitio de producción por el espermatozoide (Koppers et al., 2008). Así, los espermatozoides en équidos, que están continuamente expuestos a altos niveles de ERO agotan sus reservas de antioxidantes y en última instancia, se deterioran a medida que son conducidas a la vía intrínseca de la apoptosis o muerte celular (Aitken et al., 2012). Por tal razón, es fundamental evaluar el efecto de sustancias moduladoras del metabolismo espermático como la metformina, la cual ha sido previamente usada en los protocolos de crioconservación (Bertoldo et al., 2014). Varios estudios han relacionado a la metformina, una sustancia antihiperglicemiante, con la función espermática y, por lo tanto, con la fertilidad del macho (Banihani, 2016). Se ha demostrado que el tratamiento oral con metformina, aumenta el recuento de espermatozoides epididimarios, mejora su movilidad y disminuye su morfología anormal (Fang et al., 2012). Así mismo, se ha reportado que la suplementación con metformina, mejora la viabilidad, la integridad del acrosoma y del ADN espermático (Banihani, 2016; Nguyen et al., 2015), demostrando que esta sustancia mejora la flexibilidad metabólica y la utilización de glucosa en varios tipos de células, incluyendo los espermatozoides (Nguyen et al., 2015).

Entre los antioxidantes con resultados prometedores se encuentra la berberina, un metabolito vegetal que pertenece al grupo de los alcaloides de isoquinolina con una fuerte actividad biológica y farmacológica (Och et al., 2020). La berberina es aislada de muchos tipos de plantas medicinales (Tillhon et al., 2012). Se ha descrito que la berberina muestra muchas bioactividades, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias,

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

anticancerígenas, antidiabéticas, antiobesidad y antimicrobianas (Xiong et al., 2022). En el ámbito reproductivo la berberina ha mostrado su capacidad para favorecer la función testicular, la espermatogénesis, la ovulación y la receptividad endometrial en diferentes especies animales (Najaran et al., 2019; Gao et al., 2020; Song et al., 2020; Zhi et al., 2021). Así mismo, posee un efecto protector sobre la viabilidad y la tasa de movilidad del semen humano (Chen et al., 2016); mientras que en el semen bovino tiene capacidad de protección de la movilidad, viabilidad y estado oxidativo de los espermatozoides a las 24 h de almacenamiento (Tvrdá et al., 2019).

Los autores de este proyecto no hallamos trabajos en los que se haya empleado la metformina y la berberina en semen de burros, y mucho menos en procesos de criopreservación seminal de dicha especie, por lo tanto, su evaluación podría favorecer la formación de bancos de germoplasma para la especie, mitigando las amenazas presentes en la población asnal en el mundo (Panzani at al., 2017).

Buscando dar solución a los problemas planteados, surgen las siguientes preguntas de investigación:

¿Es posible que moléculas como la berberina y la metformina tengan un efecto en el metabolismo y/o la conservación de semen de los asnos criollos colombianos?

¿Es factible que la suplementación con metformina y/o la berberina afecten positivamente la calidad posdescongelación de semen de burros?

¿Existe un efecto de la suplementación con metformina y/o la berberina sobre la apoptosis posdescongelación de los espermatozoides de burros?

Así mismo, se establecen las siguientes hipótesis de investigación:

H_1: La suplementación con berberina y/o metformina tiene un efecto positivo sobre el metabolismo y/o la conservación de semen de burro

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

H_0: La suplementación con berberina y/o metformina no tiene un efecto positivo sobre el metabolismo y/o la conservación de semen de burro

3.2 MARCO TEÓRICO (*Máximo 3.000 palabras)*

Los burros pertenecen al orden *perissodactyla*, a la familia *Equidae*, al género *Equus*. Los burros domésticos pesan entre 80 y 480 kg y oscilan entre 80 y 160 cm de altura. En promedio viven entre 30 y 35 años y pueden trabajar hasta un período avanzado. Éstos son valorados por su fácil cuidado y por su resistencia física y a enfermedades (Kugler et al., 2008).

Las razas de burros se encuentran en grave peligro de extinción, donde se ha producido una disminución sustancial en el tamaño de la población, esto ha generado una variabilidad genética en la especie (Bottrel et al., 2018). De las especies de interés agropecuario el burro, ha sido la especie más afectada por la industrialización, la baja población en el medio rural y la mecanización de la agricultura ha llevado a una disminución de hasta el 80% de los burros para el siglo XX (Rota et al., 2018). Solo en Colombia se presentó una reducción cercana al 77% de la población de asnos entre el 2006 y el 2016 (FAO STAT, 2018). El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (2014), reportó que la población de burros criollos en el país era para el 2010 de 171.798 animales y para el año 2013 hubo una drástica reducción a 63.000 ejemplares. De igual forma, la FAO (2014) indica que la mayoría de razas de burro en el mundo carecen de un censo de poblacional y que además se encuentran en estado crítico o riesgo de extinción.

Otra de las consecuencias de la reducción de la población en los burros, se ha dado por la exportación indiscriminada e ilegal de pieles de estos animales hacia la China, para la producción de un medicamento tradicional llamado “Ejiao”, lo que ha conllevado a nivel mundial a una reducción considerable en la población de estos especímenes en países como Egipto, Mexico, Brasil, Etiopía, Kenia y Colombia (Revista Semana, 2017; The Donkey Sanctuary, 2017).

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Igualmente es destacable que, uno de los intereses en la crianza del burro como reproductor es para la producción de mulares (Vidament et al., 2009, Madison et al., 2013). Debido a que estos son muy deseables en el medio rural, porque reúnen las mejores características de las dos especies en un único animal (Santos, 1994, Oliveira et al., 2014). Así mismo, el interés en la cría de burros está aumentando tanto en un intento de preservar la biodiversidad como para nuevos usos en los campos de producción de leche, actividades sociales como onoterapia (terapia con burros) y el entretenimiento (Rota et al., 2018).

Criopreservación de semen

La criopreservación o congelación de semen es una técnica que permite mantener las células a baja temperatura sin perder su viabilidad y utilidad, teniendo como objetivo inhibir la actividad metabólica de los espermatozoides, garantizando su vitalidad y funcionalidad a través del tiempo y permitiendo conservarlo indefinidamente (Cruz *et al.,* 2006).

Canisso et al., (2008) reportan que aparentemente, el primer trabajo sobre congelación de semen de burros fue realizado por Polge y Minotakis (1964), con un diluyente compuesto por yema de huevo y glicerol, siguiendo la metodología de congelación del semen bovino. Por otra parte, Krause & Grove, (1967) evaluaron diluyentes basados en glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo y glicerol en semen de burros y caballos, siguiendo la metodología del semen bovino en pellets, obteniendo movilidades post-descongelación del 50% aproximadamente, con resultados de fertilidad muy variables.

En la congelación del semen se genera una alteración de la integridad de las macromoléculas de los espermatozoides (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas); lo cual compromete la fisiología normal y funcionalidad (Guasti et al., 2012). Se ha descrito que uno de los factores más relacionados con la aparición de estas alteraciones, es el estrés oxidativo del semen provocado por los choques térmicos en el proceso de criopreservación (Membrillo Ortega et al., 2003).

Dentro de los procesos de criopreservación de los espermatozoides existen varias metodologías, las cuales varían principalmente en las velocidades de descenso de

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

temperatura y en las concentraciones de los crioprotectores utilizados. Varios crioprotectores han sido evaluados en el proceso de criopreservación, como el glicerol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol y la dimetilformamida (Medeiros et al., 2002; Nouri et al., 2013). De igual forma se han adicionado sustancias de origen animal como la yema de huevo, que contiene esencialmente colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad, que previenen la formación de cristales de hielo, protegiendo al espermatozoide contra las alteraciones térmicas durante los procesos de congelación y descongelación (Nouri et al., 2013). Como crioprotectores no permeables se han utilizado disacáridos como la sucrosa y la trehalosa, los cuales protegen a los espermatozoides del choque térmico inducido por las bajas temperaturas, debido a que tienen la capacidad de generar un balance entre la presión osmótica intracelular y extracelular; además, disminuyen la temperatura de transición para la formación de hielo intracelular, lo cual previene su formación (Pan et al., 2017).La trehalosa tiene también, la capacidad de modificar la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides, ya que se incorpora a la bicapa de fosfolípidos y le da una mayor estabilidad durante el proceso de congelación (Aboagla & Terada, 2004). Adicionalmente se le han atribuido algunos efectos antioxidantes a la trehalosa, relacionados con su habilidad de proteger las membranas plasmáticas durante la congelación, debido al incremento de los niveles de glutatión y la disminución de la peroxidación lipídica (Aisen et al., 2005). También se le ha relacionado con una mayor integridad funcional del acrosoma y la mitocondria, y un incremento en la movilidad espermática post-descongelación (Liu et al., 2016). En un estudio reciente, se reportó que la vitrificación de espermatozoides humanos usando 0.1 M de trehalosa, incrementó su movilidad (Schulz et al., 2017). (Perez-Marin et al., 2016a), evaluaron la vitrificación de espermatozoides equinos con el uso de diferentes concentraciones de trehalosa y de sacarosa, encontrando una mayor movilidad progresiva post-descongelación a bajas concentraciones de estos disacáridos (0.15 M y 0.3 M de sacarosa y 0.15 M de trehalosa). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los mismos.

Del mismo modo, se ha evaluado la acción sinérgica de algunos azúcares como crioprotectores no permeables, lo cual podría reducir la citotoxicidad si se compara con el uso de estos compuestos por separado (Perez-Marin et al., 2016b). Por otro lado, se ha reportado que el uso de bajas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) a los

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

diluyentes de congelación para semen, produce un leve incremento de la osmolaridad del medio, lo cual se ha relacionado con mayores porcentajes de viabilidad espermática. Sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado (Nang et al., 2012). La BSA es una macromolécula que se absorbe en la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides, donde juega un papel protector. Por otra parte la BSA se ha descrito de forma exitosa como un eliminador de radicales libres ante el estrés oxidativo y de la protección de la membrana plasmática ante los choques térmicos generados en la congelación y descongelación de espermatozoides (Uysal & Bucak, 2007) Adicionalmente transporta una alta cantidad de ácidos grasos libres, que actúan como fuente de energía extra para los espermatozoides (Hossain et al., 2007). Otros estudios han reportado un efecto antioxidante de la BSA, relacionado con el aumento en la integridad de la membrana plasmática y una disminución de la fragmentación del ADN, debido a la disminución de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Matsuoka et al., 2006). Por otro lado, los crioprotectores permeables tienen la función de brindar a las células protección del estrés térmico, sin embargo, pueden constituirse en un factor generador de estrés osmótico y oxidativo, que puede alterar los espermatozoides.

La criopreservación del semen requiere de muchos pasos, entre ellos la centrifugación del eyaculado (Contri et al., 2012), ésta con el fin de retirar el plasma seminal, considerado como perjudicial para los espermatozoides durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Carver & Ball, 2002). En los équidos esta condición no deseada, es reducida con la dilución del semen o con la eliminación parcial o total del plasma seminal (Miró et al., 2009).

Varias ventajas han sido atribuidas a la utilización de semen de burro descongelado en programas de inseminación artificial, algunas de éstas son la eliminación del rechazo de las yeguas por parte del comportamiento sexual de los asnos durante el cortejo y el apareamiento, también el hecho de superar las limitaciones físicas con respecto al tamaño de los animales en el servicio y al fácil movimiento de los recursos genéticos (Madison et al., 2013). Es así, como la congelación de semen asnal ha tenido un papel importante, mediante la creación de bancos de germoplasma que podrían ser utilizados en un futuro, para reducir la depresión genética observada en las poblaciones (Vilés et al., 2013). Los

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

espermatozoides de los asnos han demostrado ser resistentes a los procesos de refrigeración y criopreservación, al mantener características adecuadas de calidad seminal (Vilés et al., 2013); sin embargo, la congelación del semen se relaciona con daños en el espermatozoide, particularmente sobre la membrana plasmática y otras organelas (Ortiz et al., 2014).

Por otra parte, en la membrana plasmática de los espermatozoides equinos, contiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados muy susceptibles a la peroxidación lipídica, la cual altera la movilidad y la capacidad de fecundación, así como produce daño estructural de la membrana plasmática (Aurich et al., 1997; Isachenko et al., 2004; Aitken, 1995; Mesa & Henao, 2012).

Hasta la fecha, son escasas las investigaciones donde se aborda la congelación de semen de burros criollos colombianos y es común que se adapten procesos empleados en la especie equina (Canisso et al., 2010; Canisso et al., 2008). El glicerol (GLY) es posiblemente el crioprotector más empleado en la congelación del semen de équidos (Hoffmann et al., 2011; Rota et al., 2012). Sin embargo, se ha sugerido que la dosis tóxica de GLY en espermatozoides de burro parece ser casi la mitad que dicha dosis en espermatozoides equinos, además de comprometer la fertilidad del semen congelado (Vidament et al., 2009b). Entre las principales alternativas, la dimetilformamida (DMF) es conocida por su efecto crioprotector en semen equino, que se atribuye a su menor toxicidad y su mayor capacidad de difusión a través de la membrana de los espermatozoides (Alvarenga et al., 2005), debido a su menor peso molecular. En un estudio reciente, se describió un efecto positivo de la DMF sobre la movilidad y la integridad de membrana de espermatozoides criopreservados de la raza asnal andaluza (Acha et al., 2016a). Montoya et al., (2017), evaluaron diferentes crioprotectores para la congelación de semen de asnos criollos colombianos, empleando GLY o DMF, varias concentraciones de yema de huevo centrifugada, así como de plasma seminal, y encontraron que el semen congelado con 5% de DMF, 5% de yema de huevo centrifugada y 10% de plasma seminal, presentó valores superiores de movilidad, vitalidad e integridad de membrana plasmática post-descongelación.

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Debido a la mayor sensibilidad que presentan los espermatozoides de asno al uso de crioprotectores permeables, se han sugerido entonces la sustitución de estas sustancias por agentes no permeables, usando diluyentes de congelación a base de azúcares con la combinación de BSA (Diaz-Jimenez, , et al., 2018). Esta alternativa ha mostrado resultados satisfactorios para la movilidad espermática, la integridad de membrana y del ADN, y la fertilidad en humanos (Isachenko et al., 2004), caninos (Sánchez et al., 2011), peces (Merino et al., 2011) y rumiantes salvajes (Pradiee et al., 2015), después del proceso de criopreservación. (Diaz-Jimenez, et al., 2018) , suplementaron con 1% de BSA y diferentes concentraciones de sacarosa el semen de asnos, encontrando un aumento de la movilidad y cinética espermática post-descongelación cuando usaron 0.25 M de sacarosa. Así mismo, compararon el uso de glicerol vs sacarosa a 0.25 M, obteniendo una mayor integridad de membrana plasmática con el uso de este disacárido. El uso de concentraciones más altas de sacarosa en los diluyentes de congelación, podría exponer a las células espermáticas a un estrés osmótico mayor, lo cual también ha sido descrito para espermatozoides equinos (Oldenhof et al., 2013) ya que podría generar una deshidratación celular excesiva.

Uso de antioxidantes y moduladores del metabolismo como la berberina y metformina en la criopreservación de semen.

Durante los últimos años se han multiplicado los esfuerzos investigativos por identificar sustancias que aumenten la protección del semen equino sometido a criopreservación. Los espermatozoides, que están continuamente expuestos a altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) agotan sus reservas de antioxidantes y en última instancia, se deterioran a medida que son conducidas a la vía intrínseca de la apoptosis o muerte celular (Aitken et al., 2012; Pena et al., 2011). A pesar del hallazgo de algunos efectos positivos principalmente derivados del uso de diversos crioprotectores, diluyentes y moléculas con acción antioxidante (Restrepo et al., 2012), es fundamental evaluar el efecto post-descongelación de otras moléculas cuyo potencial de protección del semen equino ha sido estudiada de forma preliminar; tal es el caso de las sustancias moduladoras del metabolismo, las cuales han sido previamente usadas en los protocolos de crioconservación. Estas sustancias, mejoran la flexibilidad metabólica y la utilización de glucosa en varios tipos de células, incluyendo los espermatozoides (Nguyen et al., 2015),

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

mediante la activación de la proteína quinasa 5 'activada por AMP (monofosfato de adenosina) o AMPK (proteína quinasa activada por AMP) (Meneses et al., 2015). El AMPK desempeña un papel central para traducir las comunicaciones endocrinas en respuestas adaptadas destinadas a ahorrar energía cuando ésta es escasa o para asignarla a diversas funciones, en particular la reproducción. La reproducción es una función que consume energía y, por lo tanto, está restringida o inhibida en casos de estado energético limitado en los animales. Como sensor del estado energético celular, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis energética intracelularmente (Nguyen, 2019).

Durante la última década, varios estudios experimentales y clínicos han relacionado a la metformina, una sustancia antihiperglicemiante, con la función espermática y, por lo tanto, con la fertilidad del macho (Banihani, 2016). Se ha demostrado que el tratamiento oral con metformina, sola o en combinación con pioglitazona, otro fármaco antidiabético, aumenta el recuento de espermatozoides epididimarios, mejora su movilidad y disminuye su morfología anormal (Adaramoye y Lawal, 2014; Fang et al., 2012; Rabanni et al., 2010). Así mismo, se ha reportado que la suplementación con metformina, mejora la viabilidad, la integridad del acrosoma y del ADN espermático (Banihani, 2016; Nguyen et al., 2015). De acuerdo con un estudio realizado por Bertoldo et al. (2014), al adicionar 50 µM de metformina se mejoró la movilidad de los espermatozoides congelados. También se ha asociado con mayores niveles de fosforilación de la enzima AMPK, la cual se encuentra en la pieza intermedia del espermatozoide, lo que sugiere que este compuesto es capaz de activar esta enzima en espermatozoides como en otros tipos de células (Fryer et al., 2002). Lo anterior, podría conllevar a la utilización de rutas metabólicas diferentes a la de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), conduciendo a una menor producción de EROs mitocondrial (Koppers et al., 2008).

La suplementación con sustancias antihiperglicemiantes o moduladoras del metabolismo, ha demostrado mejorar la actividad mitocondrial del espermatozoide, así como su capacidad de captación de glucosa (Nguyen, 2019), traduciéndose en mayor movilidad espermática y sugiriendo un metabolismo mitocondrial más eficiente, o un cambio del metabolismo mitocondrial hacia las vías glicolíticas (Swegen et al., 2016). Los

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

espermatozoides del semental parecen depender predominantemente de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), y menos del metabolismo glicolítico (Gibb et al., 2014; Plaza et al., 2015). La OXPHOS tiene las ventajas de producir rápidamente altos niveles de ATP y facilitar una mayor movilidad espermática que la glicólisis; sin embargo, genera alta cantidad de ERO (especies reactivas de oxígeno), que se producen como un subproducto de la OXPHOS, siendo la mitocondria el principal sitio de producción de ERO por el espermatozoide (Koppers et al., 2008).

3.3 OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.3.1 Objetivo General

Evaluar el impacto de la berberina y la metformina en el metabolismo y la conservación de semen de burro (*Equus asinus*)

3.3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la berberina y la metformina sobre la calidad pos-descongelación de semen de burros

2. Evaluar el efecto de la berberina y la metformina sobre el metabolismo y producción de ATP en semen descongelado de burros

3. Evaluar el efecto de la berberina y la metformina sobre la viabilidad y apoptosis celular en semen descongelado de burros

3.4 METODOLOGÍA PROPUESTA

3.4.1 Diseño (*Máximo 200 palabras)*

Se utilizará un diseño de bloques al azar, donde cada asno (n=5) incluido en el estudio se establecerá como bloque, con sus respectivas muestras de semen (eyaculados n=3), en cada una de las cuales se implementarán los tratamientos del estudio (n=7=. Se producirán pajillas de semen congelado por tratamiento (n=3), las cuales serán evaluadas posdescongelación como unidades experimentales. Cada pajilla de un mismo asno,

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

eyaculado y tratamiento se considerará como repetición. Se desarrollará un trabajo experimental cuantitativo a partir de los experimentos y evaluaciones a realizarse en el Laboratorio de Biotecnología del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid (Bello, Antioquia), el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia (Rionegro, Antioquia) y en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la universidad de Antioquia (Medellín, Antioquia).

3.4.2 Características de los participantes (*Máximo 200 palabras)*

Se realizará la colecta de semen de asnos (n=5) ubicados en el suroeste de Antioquia en el Municipio de Titiribí. Los animales destinados a las colectas estarán ubicados en el suroeste Antioqueño en el municipio de Titiribí. Los animales contarán con un periodo de descanso sexual máximo de una semana, para un total de 15 eyaculados. Los ejemplares estarán entre los 4 y 8 años, todos en un régimen de mínimo una colecta semanal, con fertilidad comprobada con crías nacidas vivas y con una condición corporal de 6 a 7, en una escala entre 1 y 9, siendo 3 o menos considerado como extremadamente delgado y entre 8 y 9 como obeso (Warren, 2009). La recolección del semen se realizará mediante el método de vagina artificial. Se evaluará el volumen y la concentración de cada eyaculado. El semen será diluido en proporción 1:1 en diluyente Equiplus® (Minitube).

3.4.3 Técnicas e instrumentos de recolección de información (*Máximo 150 palabras)*

Posdescongelación se realizará la evaluación de la movilidad y cinética espermática, mediante un sistema de análisis computarizado de análisis de semen (CASA, Microptic S.L); y la funcionalidad de la membrana plasmática, mediante la prueba hipoosmótica (HOST) (Objetivo específico 1). Por citometría de flujo, se evaluará la viabilidad y la apoptosis de los espermatozoides, mediante las sondas fluorescentes SYBR-14/PI y Anexina V, respectivamente (Objetivo específico 2); así mismo, se evaluará el metabolismo espermático mediante la evaluación de la actividad de la enzima ATPasa activa en células vivas para la producción de ATP por medio de la sonda VitalTracker® y la actividad mitocondrial mediante la sonda JC1® (Objetivo específico 3). Para todas las evaluaciones por citometría de flujo se utilizará un citómetro LS Fortessa (BD Biociences) y los datos se

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

analizarán con el software Flowjo 7.6.1. Se construirá una base de datos con la información generada.

3.4.4 Procedimiento *(Máximo 250 palabras)*

La criopreservación del semen se realizará mediante un protocolo modificado (Bustamante et al., 2009). El semen diluido se centrifugará por 12 minutos a 850 x g y será descartado el sobrenadante. El precipitado se resuspenderá en Equiplus® (Minitube, Alemania) suplementado con 5% de yema de huevo centrifugada, preparada de acuerdo al protocolo de Nouri et al. (2013) y con 5% de dimetilformamida. Cada eyaculado será dividido en siete alícuotas de trabajo y suplementado de la siguiente manera: berberina a 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} mol/L; metformina a 10, 20 y 30 mM y un grupo control sin suplementación. Cada alícuota se ajustará a una concentración final de 100 x 10^6 de espermatozoide/ml. Posteriormente, el semen diluido será mantenido en refrigeración a 5°C por 60 minutos y será empacado en pajillas de 0.5ml, las cuales se someterán a vapores de nitrógeno líquido por 15 minutos, para finalmente ser almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C. Después de una semana de almacenamiento cada pajilla se descongelará en un baño de agua a 37°C y se realizarán las evaluaciones del semen descongelado previamente descritas.

3.4.5 Análisis de Información *(Máximo 200 palabras)*

Los datos serán analizados mediante el ajuste de modelos mixtos para cada variable dependiente (parámetro espermático). En cada modelo se incluirán el efecto fijo del tratamiento y el efecto aleatorio del eyaculado anidado dentro del asno. Para evaluar la normalidad de los datos será utilizada la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizará un análisis de correlación de Pearson entre las variables de calidad seminal, metabolismo espermático y apoptosis celular. La magnitud de la relación entre las variables será evaluada mediante un análisis de regresión. Las comparaciones de medias entre los tratamientos se realizarán mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia que se usará para todas las evaluaciones fue de $p<0.05$. Todos los análisis serán desarrollados mediante el software online SAS Studio 3.81.

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

3.5 CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	TIEMPO (MESES)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión de literatura												
Recolección de material de investigación (semen de asnos)												
Estandarización de los procesos de evaluación y criopreservación del semen de asnos												
Criopreservación del material biológico, semen de asnos bajo los dos antioxidantes												
Evaluación de los parámetros específicos de metabolismo y producción de ATP del semen pos-descongelación												
Evaluación de parámetros específicos de viabilidad y apoptosis de semen asnal pos-descongelación												
Análisis y discusión de resultados												
Desarrollo del informe final y compromisos de socialización y publicación.												

3.6 COMPROMISOS DE PRODUCCIÓN Y ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN

(Deberán coincidir con los requisitos de la convocatoria)

1. Un artículo publicado en una revista indexada categoría Publindex A1 o A2 (Publindex A1, Scopus Q1, Q2)

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

2. Producto de apropiación social del conocimiento: Socialización de los resultados finales de la investigación en un evento científico reconocido de ámbito nacional o internacional (EC_A).
3. Un producto resultado de investigación: Innovación en procedimiento y servicio IPP descrito en la Tabla VIII. Requerimientos, categorización y asignados a productos tecnológico certificados o validados, del anexo I. Con proyección de transferencia por el Laboratorio de Biotecnología Animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid y otros laboratorios y empresas asociadas, dedicadas a la reproducción animal y la biotecnología.
4. Evento de divulgación interna de resultados: socialización de los resultados finales de la investigación a la comunidad académica institucional del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid
5. Propuesta de impacto al currículo: Incorporación de los resultados de investigación a los módulos de la asignatura de Reproducción Animal en el programa de Tecnología e Ingeniería agropecuaria código CAG00297 y CAG0064, respectivamente. Para la línea de profundización en Ingeniería Agropecuaria en las asignaturas de Reproducción y Biotecnología Animal, código CAG00740.
6. Firma de acta de compromisos, acta de cierre de compromisos y seguimiento en un plan de calidad.
7. Incorporación de un estudiante en formación, estudiantes de pregrado (Ingeniería Agropecuaria)
8. Entrega de informe final del proyecto

3.7 RESULTADOS ESPERADOS

OBJETIVO	RESULTADO	RESPONSABLE	INDICADOR DE LOGRO	MES DE CUMPLIMIENTO
1. Evaluar el efecto de la berberina y la metformina sobre la calidad pos-descongelación	En el ámbito teórico determinar antioxidantes para prolongar la calidad de espermatozoides descongelados	Juan David Montoya Páez Alexandra Úsuga Suarez Giovanni Restrepo Betancur	Bases de datos de resultados alcanzados, tablas de evaluación estadística de resultados y documentos de	6

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

de semen de burros	en la especie asnal. En el ámbito práctico esto permitirá utilizar antioxidantes como la metformina y la berberina, como un suplemento necesario en la congelación y descongelación del semen asnal. Además, permitirá apropiar los conocimientos necesarios para implementar nuevos métodos de conservación de los espermatozoides en équidos dentro de las actividades y servicios de los laboratorios de Biotecnología del Politécnico JIC y el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional.		análisis y discusión. Apropiación de técnicas de evaluación de la calidad del semen, bajo la suplementación con antioxidantes, por parte de estudiantes de pregrado.	
2.Evaluar el efecto de la berberina y la metformina sobre el metabolismo y producción de ATP en semen descongelado de burros	En el ámbito teórico determinar si la utilización de una concentración determinada de metformina y berberina sobre el semen descongelado mejora la calidad con respecto al metabolismo y la producción de energía de los espermatozoides en los burros.	Juan David Montoya Páez Alexandra Úsuga Suarez Giovanni Restrepo Betancur	Apropiación por parte de los estudiantes participantes y en general del grupo de investigación en técnicas de vanguardia para la evaluación de semen asnal, con proyecciones de extensión al sector productivo mediante la	8

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

	En el ámbito práctico, obtener buenos resultados en la criopreservación y descongelación del semen para la conformación de bancos de germoplasma, para la diversificación y conservación de la especie. También en el ámbito práctico este proyecto permitirá apropiar los conocimientos necesarios para implementar la congelación y descongelación del semen de los asnos para su posterior uso en programas de inseminación artificial.		oferta de servicios. Formación de recurso humano representado por mínimo un estudiante de pregrado. En el campo de la docencia, los desarrollos y resultados de esta investigación serán adaptados y estarán al servicio teórico y práctico de los cursos con énfasis en reproducción y biotecnología reproductiva de los programas de Tecnología Agropecuaria e Ingeniería Agropecuaria y la Especialización en Biotecnología de la Reproducción Animal.	
3.Evaluar el efecto de la berberina y la metformina sobre la viabilidad y apoptosis celular en semen descongelado de burros	En el ámbito teórico, evaluar si antioxidantes como la metformina y berberina aportan sobre parámetros de calidad en las células espermáticas y a partir de esa misma calidad, sobre la viabilidad y la apoptosis. En el ámbito práctico se	Juan David Montoya Páez Alexandra Úsuga Suarez Giovanni Restrepo Betancur	Consolidación de los grupos de investigación en labores de extensión mediante la apropiación de conocimientos y de la oferta de servicios a los criadores de équidos y/o comunidad agropecuaria en general, favoreciendo el	10

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

	buscará la optimización del semen de asnos post-descongelado para su uso en inseminación artificial, con el fin de buscar protocolos de inseminación artificial que no conduzcan a los problemas logísticos comúnmente asociados en la técnica debido a la poca durabilidad de los espermatozoides de équidos descongelados en el tracto reproductivo de la hembra. Esto con proyección orientada al mejoramiento genético y a la preservación de la especie.		avance de la línea potencial en sistemas integrados de la producción animal. Adicionalmente se fortalecerá la capacidad técnica y científica de los grupos de investigación participantes, así como la producción académica representada en mínimo una publicación en una revista indexada categoría A1 o A2 y una ponencia en un evento académico reconocido.	

3.8 COMPROMISOS DE LAS ENTIDADES EXTERNAS PARTICIPANTES (Si Aplica)

INFORMACIÓN GENERAL DE ENTIDAD PARTICIPANTE	
Entidad	Universidad de Antioquia
NIT	NIT 890.980.040-8
País	Colombia
Dirección	Carrera. 74a #93-30
Teléfono	4600727
Dirección electrónica	ciag@udea.edu.co
Representante legal-cédula	John Jairo Arboleda Céspedes. C.C 71.631.136
Compromisos	
1. Publicación de un artículo de investigación en una revista indexada 2. Participación en un evento de carácter académico – científico, de carácter nacional o internacional, para la divulgación de los resultados de la investigación 3. Realización de un informe técnico final.	

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

INFORMACIÓN GENERAL DE ENTIDAD PARTICIPANTE	
Entidad	Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín
NIT	899.999.063-3
País	Colombia
Dirección	Cra 65 # 59A-110
Teléfono	4309000
Dirección electrónica	deproani_med@unal.edu.co
Representante legal-cédula	Dolly MontoyaCastaño. C.C 41.437.894
Compromisos	
1. Sometimiento de un artículo de investigación para publicación en una revista indexada 2. Participación en un evento de carácter académico – científico, de carácter nacional o internacional, para la divulgación de los resultados de la investigación 3. Realización de un informe técnico final.	

3.9 COMUNIDAD IMPACTADA CON EL DESARROLLO DE LA PROPUESTA (directa e indirecta)

3.9.1 Impacto Social: *(Máximo 250 palabras)*

Este proyecto se enmarca en el objetivo de desarrollo sostenible **número 15, Vida de ecosistemas terrestres**, que busca adoptar medidas urgentes y significativas para reducir la pérdida de la biodiversidad, proteger las especies amenazadas y evitar su extinción; planteando que, de las 8.300 especies conocidas de animales, el 8% ya está extinto y otro 22% corre el riesgo de desaparecer, siendo el burro una de ellas. Se contribuiría a esto, con técnicas como la criopreservación de semen, que permita la conservación de los asnales.

Además, beneficiará a la comunidad agropecuaria que requiere de asnales para diversas modalidades de trabajo, entretenimiento y conservación. Se favorece la optimización de su reproducción mediante biotecnologías como la inseminación artificial, como herramienta para la transferencia de tecnología hacia los productores, así como para el incremento de la eficiencia productiva y el fomento del desarrollo económico regional y nacional.

En el ámbito académico, tecnológico y científico se beneficiará la comunidad a través de la generación de nuevo conocimiento referente a la estandarización y aplicación de procedimientos de vanguardia para la conservación y uso de material biológico. Además, se beneficiarían los profesionales de las ciencias biológicas y agropecuarias, por la generación de nuevos servicios de extensión orientados a la reproducción animal.

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

En el ámbito social y cultural se busca avanzar en el desarrollo de productos y servicios enfocados a la extensión rural, fomentando la accesibilidad a tecnologías de vanguardia. Económicamente, se impacta al sector agropecuario, específicamente sobre la industria equina, promoviendo el desarrollo de sistemas productivos eficientes.

3.9.2 Impacto al Currículo: *(Máximo 250 palabras)*

Los hallazgos de esta investigación constituyen un aporte importante a los módulos de la asignatura de Reproducción Animal en los programas de Tecnología e Ingeniería agropecuaria (CAG00711, CAG00064) y para la electiva en Ingeniería Agropecuaria en la asignatura de Reproducción y Biotecnología Animal (CAG00740). Específicamente para Reproducción Animal en el tema del numeral 3.2 del formato FD-GC70 titulado “Técnicas de evaluación de semen”. Para Reproducción y Biotecnología Animal en el tema del numeral 2.2 del formato FD-GC70 titulado “Técnicas de evaluación de semen y criopreservación”. Esto es importante dado a la apropiación por parte de los estudiantes participantes y en general del grupo de investigación de técnicas de vanguardia en criopreservación de semen asnal, con proyecciones de extensión al sector productivo.
Por otra parte, en el desarrollo de la propuesta está inmersa institucionalmente en el Manual de Líneas de Investigación, donde se encuentran la línea matriz y potencial de investigación, el nudo problémico y la línea virtual, determinado de la siguiente forma respectivamente: Línea Matriz en Ciencias Agrarias, línea potencial en sistema integrado de producción pecuaria, en el nodo Criopreservación de gametos y embriones, y como pregunta concordante a la línea virtual la siguiente: ¿Existen moléculas o sustancias que suplementadas en los medios y soluciones de criopreservación de gametos y embriones puedan mejorar el éxito de los procesos reproductivos en que son empleadas?

3.10 ASPECTOS ÉTICOS *(Máximo 200 palabras)*

1. Marco normativo en ética de la Investigación:

En el ámbito ambiental en el desarrollo de esta propuesta se implementarán los mecanismos para la disposición de desechos que puedan presentar riesgo biológico, teniendo en cuenta lo establecido en la normatividad local y nacional (Acuerdo 007 de mayo 17 de 1993 del Concejo de Medellín, código sanitario nacional Ley 9 de 1979).
Todos los procedimientos se llevarán a cabo teniendo como referencia la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Reino Unido de 1986 y las directrices asociadas, la Directiva de la UE 2010/63 / UE para experimentos con animales o la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicaciones NIH N ° 8023, revisadas 1978).

2. Riesgos para personas o animales de la investigación a realizarse, según el caso.

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Riesgos biológicos: Existe el riesgo de reacciones comportamentales negativas por parte de los animales, que puedan afectar a quien esté llevando a cabo los procesos y por medio de una herida se inoculan microorganismos que generen infecciones que pueden ser leves o graves. El semen como muestra biológica también representa un riesgo sanitario dado que existe una cantidad de microorganismos presentes en este.

Riesgos físicos: La manipulación de los animales y los instrumentos de campo y laboratorio (electrodo, jeringas, etc.) puede ocasionar accidentes que pongan en riesgo la integridad de las personas involucradas.

Dentro de las consideraciones éticas, con este proyecto no se pondrá en riesgo el bienestar de los animales, dado que no se realizarán intervenciones invasivas o dolorosas. Los investigadores y demás personal adscrito a la investigación contarán con adecuadas medidas de protección desde el punto de vista mecánico y biológico.

3. Acciones de contingencia en caso de presentarse alguno de los riesgos identificados en el punto anterior.

Se contará con el apoyo y monitoreo constante de un médico veterinario con el fin de realizar intervenciones médicas en caso de requerirse.

Todos los proyectos que sean **aprobados se deben presentar al Comité de Ética Institucional (CEPI)**, y serán recibidos para su evaluación siempre y cuando se envíe la siguiente información en formato electrónico al email cepi@elpoli.edu.co.

3.10.1 Consentimiento informado (Anexo).

3.10.2 Cuestionarios o formularios que se utilizarán para recoger información de los participantes.

3.10.3 Copia de aprobación del proyecto por otros comités de ética de investigación, (aplica solo en caso de que los tenga).

Nota: El comité de ética podrá aprobar, aprobar con modificaciones o rechazar las propuestas con base en este ítem.

4.0 FUNCIONES DEL ESTUDIANTE

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	COMPROMISOS
Yulitza Tatiana Peñuela Guzmán	Revisión bibliográfica constante. Acompañamiento y formación en el desarrollo de los procesos de recolección, criopreservación y evaluación de material biológico en los Laboratorios de Biotecnología Animal y Reproducción Animal. Participación activa en la estandarización y ejecución de los

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

	protocolos. Análisis de los resultados preliminares.

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

5. PRESUPUESTO

Tabla 5.1 Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación.

RUBROS	FUENTES				TOTAL
	CONTRAPARTIDA PCJIC		OTRAS ENTIDADES *		
	Flujo de Efectivo	Recursos Propios	Flujo de Efectivo	Recursos Propios	
Personal (*Integrantes equipo Investigador***)**		13’860.000		45’736.176	59’596.176
Equipos	7’000.000	60’390.000			67’390.000
Software					
Materiales y suministros	25’000.000	5’000.000		15’000.000	45’000.000
Salidas de campo	6’000.0000				6’000.000
Publicaciones y patentes	2’000.000				2’000.000
Prestación de servicios profesionales	18’000.000				18’000.000
Viajes	2’000.0000				2’000.000
Totales	**$60’000.000**	**$79’250.000**		**$60’736.176**	**$199’986.176**

*Universidad Nacional de Colombia y Universidad de Antioquia

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Tabla 5.1.1. Descripción mensual del valor de la ejecución del presupuesto

RUBROS	EJECUCIÓN MENSUAL											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Personal (*Integrantes equipo Investigador*)												
Equipos		7’000.0000										
Software												
Materiales y suministros	12’500.000	12’500.000										
Salidas de campo	3’000.0000	3’000.000										
Publicaciones y patentes												2’000.000
Prestación de servicios profesionales						8’000.0000		10’000.000				
Viajes											2’000.0000	
Totales	**$15’500.000**	**$21’500.000**				**$8’000.000**		**10’000.000**			**$2’000.000**	**$2’000.000**

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Tabla 5.2 Descripción de los gastos de personal.

INVESTIGADOR / COINVESTIGADOR/ ESTUDIANTE EN FORMACIÓN	FORMACIÓN ACADÉMICA	FUNCIÓN DENTRO DEL PROYECTO	DEDICACIÓN (hora / semana)	FUENTES				TOTAL
				Contrapartida PCJIC		Otras entidades (Universidad de Antioquia[1] – Universidad Nacional[2])		
				Flujo de efectivo	Recursos Propios	Flujo de efectivo	Recursos Propios	

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Juan David Montoya Páez	Ingeniero Agropecuario, Magister en Ciencias Agrarias, Doctor en Biotecnología	Investigador principal	5		13’860.000			**13’860.000**
Alexandra Úsuga Suarez[1]	Medico Veterinaria Zootecnista, Doctor en Biotecnología	Coinvestigador	3				7’254.576	**7’254.576**
Giovanni Restrepo Betancur[2]	Médico Veterinario, Zootecnista, Magister en Biotecnología, Doctor en Biotecnología	Coinvestigador	4				38’481.600	**38’481.600**
TOTAL					**$13’860.000**		**$45’736.176**	**$59’596.176**

Tabla 5.3 Descripción de los equipos que se planea adquirir y de uso propio.

EQUIPO	JUSTIFICACIÓN	FUENTES		TOTAL
		Contrapartida PCJIC	Otras entidades	

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

		Flujo de efectivo	Recursos Propios	Flujo de efectivo	Recursos Propios	
Placa de calefacción	Adquisición de una platina térmica para mantener la temperatura de las muestras de semen pos-descongelación	$ 7’000.000				**$ 7’000.000**
Congelador programable			$ 3’800.000			**$ 3’800.000**
Espectrofotómetro			$ 2’800.000			**$ 2’800.000**
Termo de almacenamiento 47 litros			$ 1’000.000			**$ 1’000.000**
Termo de transporte			$ 500.000			**$ 500.000**
Juego de micropipetas			$ 520.000			**$ 520.000**
Agitador magnético cuatro puestos con calefacción			$ 350.000			**$ 350.000**
Baño María 10 litros			$ 300.000			**$ 300.000**
Autoclave			$ 150.000			**$ 150.000**
Centrífuga			$ 2’600.000			**$ 2’600.000**
Cámara de flujo			$ 3’000.000			**$ 3’000.000**
Nevera 4º C			$ 100.000			**$ 100.000**
Computador			$ 100.000			**$ 100.000**

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Fotómetro			$ 570.000			**$ 570.000**
Sistema Sca			$ 15’000.000			**$ 15’000.000**
Balanza analítica			$ 500.000			**$ 500.000**
MRS1 empaque			$ 20’000.000			**$ 20’000.000**
Equitainer			$ 500.000			**$ 500.000**
Microscopio Fuorescencia			$ 4’500.000			**$ 4’500.000**
Microcentrífuga			$ 800.050			**$ 800.000**
Estereomicroscopio			$ 1’000.000			**$ 1’000.000**
TOTAL		**$ 7’000.000**	**$ 58’090.000**			**$ 65’090.000**

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Tabla 5.4 Descripción de software que se planea adquirir y de uso propio.

NOMBRE DE SOFTWARE	JUSTIFICACIÓN	FUENTES				TOTAL
		Contrapartida PCJIC		Otras entidades		
		Flujo de efectivo	Recursos Propios	Flujo de efectivo	Recursos Propios	
TOTAL						

Tabla 5.5 Descripción y justificación de los viajes para el cumplimiento de la presentación de resultados del proyecto en eventos de socialización.

Lugar	Justificación**	Pasajes ($)	Estadía ($)	Total días	FUENTES				TOTAL
					Contrapartida PCJIC		Otras Entidades		
					Flujo de efectivo	Recursos Propios	Flujo de efectivo	Recursos Propios	
	Viaje para la presentación de resultados en un evento académico	2’000.000			2’000.000				$2’000.000
TOTAL					**$ 2’000.000**				**$2’000.000**

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Tabla 5.6 Descripción y justificación de las salidas de campo.

Lugar /No. de viajes	Justificación**	Pasajes ($)	Estadía ($)	Total días	FUENTES				TOTAL
					Contrapartida PCJIC		Otras Entidades		
					Flujo de efectivo	Recursos Propios	Flujo de efectivo	Recursos Propios	
40	Salidas de campo para la colecta del material biológico, semen de porcinos	$150.000		40	$ 6’000.000				$ 6’000.000
TOTAL					$ 6’000.000				**$ 6’000.000**

Tabla 5.7 Materiales, suministros y bibliografía.

Materiales*	Justificación	FUENTES				TOTAL
		Contrapartida PCJIC		Otras Entidades		
		Flujo de efectivo	Recursos Propios	Flujo de efectivo	Recursos Propios	

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Insumos	Insumos para la colecta, evaluación y criorpreservación del semen. Insumos para desarrollar las pruebas de citometría de flujo	$ 12’500.000	$ 5’000.000		$ 15’000.000*	**$ 32’500.000**
Reactivos	Compra de antioxidantes. Nitrógeno liquido para la congelación del semen	$ 12’500.000				**$12’500.000**
TOTAL		$ 25’000.000	$ 5´000.000		$ 15’000.000*	$ **45’000.000**

4. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Tabla 5.8 Prestación de servicios profesionales.

Tipo de servicio	**Justificación**	**FUENTES**				**TOTAL**
		Contrapartida PCJIC		**Otras Entidades**		
		Flujo de efectivo	**Recursos Propios**	**Flujo de efectivo**	**Recursos Propios**	

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Evaluaciones seminales por citometría de flujo	Evaluación seminal por citometría de flujo, análisis de potencial de membrana mitocondrial, capacitación espermática	$ 10’000.000				$ 10’000.000
Servicios profesionales de laboratorio	Profesional adiestrado para la colecta de semen. Evaluación de parámetros de la calidad del semen por técnicas de fluorescencia	$ 8’000.000				$ 8’000.000
TOTAL		**$ 18’000.000**				**$ 18.000.000**

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

icontec ISO 9001 SC5206-1
CERTIFIED IQNet MANAGEMENT SYSTEM

4. BIBLIOGRAFÍA *(Mínimo 20 referencias)*

Aboagla, E. M. E., & Terada, T. (2004). Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, *62*(5), 809–818. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.12.003

Acha, D., Hidalgo, M., Ortiz, I., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., Gómez-Arrones, V., & Dorado, J. (2016). Freezability of Andalusian donkey (Equus asinus) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. *Reproduction, Fertility, and Development*, *28*(12), 1990–1998. https://doi.org/10.1071/RD14449

Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, De Iuliis GN. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. Biol Reprod [Internet] 2012 Nov 1; 87(5):110.

Adaramoye OA, Lawal SO. (2014). Effect of kolaviron, a biflavonoid complex from Garcinia kola seeds, on the antioxidant, hormonal and spermatogenic indices of diabetic male rats. Andrology.; 46(8): 878-886.

Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., & Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, *50*(3), 239–249. https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2005.02.002

Aitken, R. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility, and Development*, *7*(4), 659–668. https://doi.org/10.1071/RD9950659

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. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.07.001

Aurich, J. E., Schönherr, U., Hoppe, H., & Aurich, C. (1997). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, *48*(2), 185–192. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)84066-6

Ball, B. A., & Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, *22*(6), 1061–1069. https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.2001.TB03446.X

Ball, Barry A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, *107*(3–4), 257–267. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.04.014

Ball, Barry A., Gravance, C. G., Medina, V., Baumber, J., & Liu, I. K. M. (2000). Catalase activity in equine semen. *American Journal of Veterinary Research*, *61*(9), 1026–1030. https://doi.org/10.2460/AJVR.2000.61.1026

Bottrel, M., Acha, D., Ortiz, I., Hidalgo, M., Gósalvez, J., Camisão, J., & Dorado, J. (2018). Cryoprotective effect of glutamine, taurine, and proline on post-thaw semen quality and

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

DNA integrity of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, *189*, 128–135. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2017.12.021

Banihani SA. Effect of metformin on semen quality. Braz. J. Pharm. Sci. (Online). 2016 Dec; 52(4): 591-594.

Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J, Froment P. Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. Ann Transl Med [Internet] 2014 Jun 4. 2(6): 55.

Canisso, I. F., Carvalho, G. R., Morel, M. C. G. D., Guimarães, J. D., & McDonnell, S. M. (2010). Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (Equus asinus) mounting estrous horse mares (Equus caballus). *Theriogenology*, *73*(1), 56–63. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.07.026

Canisso, I. F., Carvalho, G. R., Morel, M. D., Ker, P. G., Rodrigues, A. L., Silva, E. C., & Da Silva, M. A. C. (2011). Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equine Veterinary Journal*, *43*(2), 179–183. https://doi.org/10.1111/J.2042-3306.2010.00130.X

Canisso, Igor Frederico, Souza, F. A., Marlén, J., Escobar, O., Ribeiro De Carvalho, G., Davies Morel, M. C., Capistrano Da Silva, E., Domingos Guimarães, J., & Lima, A. L. (2008). ARTÍCULO DE REVISIÓN CONGELAMIENTO DE SEMEN DE BURRO (Equus asinus) FREEZING OF DONKEY SEMEN (EQUUS ASINUS). *Rev Inv Vet Perú*, *19*(2), 113–125. www.vet.ufmg.brwww.esalq.usp.br

Carver, D. A., & Ball, B. A. (2002). Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology*, *58*(8), 1587–1595. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01049-X

Chen L, Wang T, Liu J. AB229. Effect of berberine on human sperm parameters in vitro. (2016) Transl Androl Urol. 5(Suppl 1):AB229. doi: 10.21037/tau.2016.s229.

Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Sfirro, M. P., & Carluccio, A. (2012). Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Animal Reproduction Science*, *136*(1–2), 74–80. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2012.10.022

Cruz Casallas, P. E., Medina Robles, V. M., & Velasco Santamaria, Y. M. (2006). *Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (Brycon amazonicus)*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902006000200006&script=sci_abstract&tlng=es

Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Ortiz, I., Consuegra, C., Pereira, B., Gonzalez-De Cara, C. A., Aguilera, R., Mari, G., Mislei, B., Love, C. C., & Hidalgo, M. (2018). Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, *189*, 103–109. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2017.12.013

Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Pereira, B., Ortiz, I., Consuegra, C., Bottrel, M., Ortiz, E., & Hidalgo, M. (2018). Vitrification in straws conserves motility features better than

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

spheres in donkey sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *53*, 56–58. https://doi.org/10.1111/RDA.13256

Food and Agricultural Organization (FAO). Commission on genetic resources for food and agriculture: Status and trends of Animal Genetic Resources. Disponible en: http://www.fao.org/3/a-mm278e.pdf. 2018

Fang X, Xu QY, Jia C, Peng YF. Metformin improves epididymal sperm quality and antioxidant function of the testis in diet-induced obesity rats. *Zhonghua Nan Ke Xue* [Internet] 2012 Feb; 18(2): 146-149.

Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. J Biol Chem [Internet] 2002 Jul 12; 277(28): 25226–25232.

Gao X, Liu Z, Song J, Zhang Y, Jiang H, Ma D, Wang J, Yuan P, Li R, Bai J, Wang T, Wang S, Liu J, Liu X. Berberine is sufficient to restore the destroyed seminiferous tubule structure and hypospermatogenesis in diabetes mellitus. Clin Transl Med. 2020 Oct;10(6):e193. doi: 10.1002/ctm2.193

Gibb, Z., Lambourne, S. R., Curry, B. J., Hall, S. E., & Aitken, R. J. (2016). Aldehyde Dehydrogenase Plays a Pivotal Role in the Maintenance of Stallion Sperm Motility. *Biology of Reproduction*, *94*(6). https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.116.140509

Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. Biol. Reprod [Internet] 2014 Jul 30; 91(3): 77,1-10.

Guasti, P. N., Monteiro, G. A., & Papa, F. O. (2012). *Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides equinos*. Veterinária e Zootecnia. https://repositorio.unesp.br/handle/11449/141249?show=full

Guasti, P. N., Souza, F. F., Scott, C., Hartwig, F. P., Papa, P. de M., Santos, G. A. de M. dos, Freitas-Dell'aqua, C. de P., & Papa, F. O. (2014). Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. *Currículo Lattes*, *34*(1), 84–85. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2013.10.057

Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., & Sieme, H. (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified "good" or "poor" for freezing. *Animal Reproduction Science*, *125*(1–4), 112–118. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2011.03.001

Hossain, M. D. S., Hyeong, L. J., Miah, A. G., & Tsujii, H. (2007). Effect of fatty acids bound to bovine serum albumin-V on acrosome reaction and utilization of glucose in boar spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, *6*(2), 109–115. https://doi.org/10.1111/J.1447-0578.2007.00173.X

Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I. I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., & Van Der Ven, H. (2004). Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biology of Reproduction*, *71*(4), 1167–1173. https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.104.028811

Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

spermatozoa. J Clin Endocrinol Metab.; 93(8): 3199–3207.

Kugler, W., Grunenfelder, H.-P., & Broxham, E. (2008). Donkey Breeds in Europe. *Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe*, 5–62. http://www.monitoring.eu.com

Liu, J., Tanrikut, C., Wright, D. L., Lee, G. Y., Toner, M., Biggers, J. D., & Toth, T. L. (2016). Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology*, *73*(2), 162–167. https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2016.08.004

Madison, R. J., Evans, L. E., & Youngs, C. R. (2013). The Effect of 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin on Post-Thaw Parameters of Cryopreserved Jack and Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(4), 272–278. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.07.021

Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., & Fukui, Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *The Journal of Reproduction and Development*, *52*(5), 675–683. https://doi.org/10.1262/JRD.18033

Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, *58*(2–4), 273–276. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00898-1

Membrillo Ortega, A., Izquierdo, A. C., & Juan José Hicks Gómez, Ivonne María Olivares-Corichi, V. M. M. T. y J. de J. V. M. (2003). *Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión*. Interciencia. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200006

Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., & Isachenko, V. (2011). Fish (Oncorhynchus mykiss) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Animal Reproduction Science*, *124*(1–2), 125–131. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2011.02.023

Mesa, A. M., & Henao, G. (2012). *Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos | Rev. MVZ Córdoba;17(1): 2908-2915, ene.-abr. 2012. | LILACS*. Rev. MVZ Córdoba. https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-620190

Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural De Colombia. 2020. Cadena equina, asnal y mular. Documento disponible en: https://sioc.minagricultura.gov.co/Equino/Documentos/005%20-%20Documentos%20T%C3%A9cnicos/Diagnostico%20Cadena%20Equina,%20Asnal%20y%20Mular.pdf. Consultado el 10 de abril de 2022

Meneses MJ, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF. The Antidiabetic Drug Metformin and Male Reproductive Function: An Overview. Int J Diabetol Vasc Dis Res [Internet] 2015 Abr 20; 3(1e): 1-2.

Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T., & Peñalba, A. (2009). Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalonian donkey semen. *Theriogenology*, *72*(8), 1017–1022. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.06.012

Miró, Jordi, & Papas, M. (2018). Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, *65*, 38–43. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2017.11.007

Montoya Páez, J. D., Rojano, B. A., Restrepo Betancur, G., Montoya Páez, J. D., Rojano, B. A., & Restrepo Betancur, G. (2017). Suplementación con plasma seminal y relación de sus componentes con la calidad de semen congelado-descongelado de asnos (Equus asinus). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *8*(3), 233–242. https://doi.org/10.22319/RMCP.V8I3.4499

Montoya, J. D., Rojano, B., & Restrepo, G. (2017). Efecto de la suplementación del diluyente sobre la calidad del semen de asno a la descongelación. *Archivos de Zootecnia*, *66*(255), 333. https://doi.org/10.21071/az.v66i255.2508

Najaran, H., Rashtbari, H., Mohammadi, A. et al. The protective effect of coenzyme Q10 and berberine on sperm parameters, with and without varicocelectomy in rats with surgically induced varicoceles. Comp Clin Pathol 28, 479–485 (2019). https://doi.org/10.1007/s00580-018-2850-y

Nang, C. F., Osman, K., Budin, S. B., Ismail, M. I., Jaffar, F. H. F., Mohamad, S. F. S., & Ibrahim, S. F. (2012). Bovine serum albumin: survival and osmolarity effect in bovine spermatozoa stored above freezing point. *Andrologia*, *44 Suppl 1*(SUPPL.1), 447–453. https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2011.01203.X

Nguyen TM, Seigneurin F, Froment P, Combarnous Y, Blesbois E. The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. PLoS one. 2015 Jul 29; 10(7): e0134420.

Nguyen TM. Role of AMPK in mammals reproduction: Specific controls and whole-body energy sensing. C R Biol [Internet] 2019 Dec 1; 342(1-2): 1-6.

Nouri, H., Towhidi, A., Zhandi, M., & Sadeghi, R. (2013). The effects of centrifuged egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze miniature caspian horse semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(12), 1050–1053. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2013.03.184

Och, A.; Podgórski, R.; Nowak, R. Biological Activity of Berberine—A Summary Update. Toxins 2020, 12, 713. https://doi.org/10.3390/toxins12110713

Oldenhof, H., Gojowsky, M., Wang, S., Henke, S., Yu, C., Rohn, K., Wolkers, W. F., & Sieme, H. (2013). Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biology of Reproduction*, *88*(3). https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.112.104661

Oliveira, R. R., Rates, D. M., Pugliesi, G., Ker, P. G., Arruda, R. P., Moraes, E. A., &

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Carvalho, G. R. (2014). Use of cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *49*(5), 845–850. https://doi.org/10.1111/RDA.12379

Ortiz, I., Dorado, J., Ramírez, L., Morrell, J. M., Acha, D., Urbano, M., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., & Hidalgo, M. (2014). Effect of single layer centrifugation using Androcoll-E-Large on the sperm quality parameters of cooled-stored donkey semen doses. *Animal*, *8*(2), 308–315. https://doi.org/10.1017/S1751731113002097

Pan, C. ying, YU, S., ZHANG, P. fei, WANG, B., ZHU, Z. dong, LIU, Y. ying, & ZENG, W. xian. (2017). Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of Integrative Agriculture*, *16*(5), 1120–1129. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61489-2

Panzani, D., Rota, A., Tesi, M., Fanelli, D., & Camillo, F. (2018). Update on Donkey Embryo Transfer and Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, *65*, 50–54. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2017.11.012

Plaza Davila M, Martín Muñoz P, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Balao da Silva C, Pena FJ. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and ATP reduced production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. PLoSOne [Internet] 2015 Sep 25; 10(9): e0138777.

Pena FJ, Garcia BM, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ferrusola CO. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? Theriogenology [Internet] 2011 Aug 9; 76(7): 1177-1186.

Perez-Marin, C. C., Galisteo, I., Perez-Rico, A., & Galisteo, J. (2016a). Effects of breed, age, season, and multiple ovulations on cyclic, PGF2α-induced, and postpartum estrus characteristics in Spanish jennies. *Theriogenology*, *85*(6), 1045–1052. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.11.015

Perez-Marin, C. C., Galisteo, I., Perez-Rico, A., & Galisteo, J. (2016b). Effects of breed, age, season, and multiple ovulations on cyclic, PGF2α-induced, and postpartum estrus characteristics in Spanish jennies. *Theriogenology*, *85*(6), 1045–1052. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.11.015

Pradiee, J., Esteso, M. C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J. A., Urrutia, B., & Santiago-Moreno, J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (Capra pyrenaica) spermatozoa. *Theriogenology*, *84*(9), 1513–1522. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.07.036

Revista Semana. El trágico destino de los burros que se desaparecen en la Costa. Tomado de https://www.semana.com/nacion/articulo/desaparecen-burros-en-lacosta/519103. 2017

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Rabanni SI, Devi K, Khanam S. Role of Pioglitazone with Metformin or Glimepiride on Oxidative Stress-induced Nuclear Damage and Reproductive Toxicity in Diabetic Rats. *Malays J Med Sci* [Internet] 2010 Jan; 17(1): 3-11.

Restrepo Betancur G, Pizarro López E, Rojano BA. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. Rev. Lasallista Investig [Internet] 2012 Oct 23; 9(1): 128-136.

Rota, A., Panzani, D., Sabatini, C., & Camillo, F. (2012). Donkey jack (Equus asinus) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, *78*(8), 1846–1854. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.07.015

Rota, Alessandra, Puddu, B., Sabatini, C., Panzani, D., Lainé, A. L., & Camillo, F. (2018). Reproductive parameters of donkey jacks undergoing puberty. *Animal Reproduction Science*, *192*, 119–125. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.02.021

Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, *43*(4), 233–241. https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2010.01054.X

Schulz, M., Risopatrón, J., Matus, G., Pineda, E., Rojas, C., Isachenko, V., Isachenko, E., & Sánchez, R. (2017). Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. *Andrologia*, *49*(9). https://doi.org/10.1111/AND.12757

Song J, Gao X, Tang Z, et al. (2020). Protective effect of Berberine on reproductive function and spermatogenesis in diabetic rats via inhibition of ROS/JAK2/NFκB pathway. Andrology. 8: 793–806. https://doi.org/10.1111/andr.12764

Swegen A, Lambourne SR, Aitken RJ, Gibb Z. Rosiglitazone Improves Stallion Sperm Motility, ATP Content, and Mitochondrial Function. Biol. Reprod [Internet] 2016 Sep 28; 95(5): 107.

Tillhon M, Guamán Luis, Lombardi P, Scovassi A.I. (2012). Berberine: New perspectives for old remedies, Biochemical Pharmacology, 84;10:1260-1267. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.018.

The Donkey Sanctuary. What is ejiao? Tomado de www.thedonkeysanctuary.org.uk. 2017

Tvrdá E, Greifová H, Ivanič P, Lukáč N. (2019). In vitro effects of berberine on the vitality and oxidative profile of bovine spermatozoa. International Journal of Biological, Life and Agricultural Sciences, 12(10). https://doi.org/10.5281/zenodo.3566257

Vidament, M., Vincent, P., Martin, F. X., Magistrini, M., & Blesbois, E. (2009). Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science*, *112*(1–2), 22–35. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.03.016

Vilés, K., Rabanal, R., Rodríguez-Prado, M., & Miró, J. (2013). Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology*, *79*, 1019–1026. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.006

Xiong, R.-G.; Huang, S.-Y.; Wu, S.-X.; Zhou, D.-D.; Yang, Z.-J.; Saimaiti, A.; Zhao, C.-N.; Shang, A.; Zhang, Y.-J.; Gan, R.-Y.; et al. Anticancer Effects and Mechanisms of

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

Berberine from Medicinal Herbs: An Update Review. Molecules 2022, 27, 4523. https://doi.org/10.3390/molecules27144523

Zhi Wang, Kexin Nie, Hao Su, Yueheng Tang, Hongzhan Wang, Xiaohu Xu, Hui Dong, (2021). Berberine improves ovulation and endometrial receptivity in polycystic ovary syndrome, Phytomedicine, 91: 153654. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153654.

7. ASPECTOS NORMATIVOS ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

El Politécnico colombiano Jaime Isaza Cadavid como entidad de educación superior e investigación, viene fortaleciendo los procesos para garantizar el apoyo a grupos e investigadores que buscan la generación de nuevo conocimiento, es por tal motivo que se conforma el Comité de Ética de la Institución CEPI cuyo objetivo es evaluar el cumplimiento de la normatividad nacional e internacional relacionada con la ética de la investigación, garantizando la protección animal y humana en la investigación y la cualificación de la producción científica dentro de la institución.

Los proyectos deben estar ajustados a la normatividad internacional tal como la declaración de Helsinki, las pautas éticas para la investigación biomédica preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas –CIOMS, el Código Núremberg y a los parámetros establecidos en la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia, la ley 84 de 1989 en los casos que competa.

Adicionalmente se debe tener en cuenta la siguiente normativa (en caso de que aplique):

- República de Colombia. Ministerio de Salud. Resolución 8430. 4 de octubre de1993.
- República de Colombia. Ministerio de la Protección Social. Resolución 2378. 25 de junio de 2008.
- República de Colombia. Ministerio de Medio Ambiente. Resolución 068. 22 de enero de 2002.
- República de Colombia. Congreso de la Republica. Ley 84. 27 de diciembre de 1989.
- República de Colombia. Congreso de la Republica. Ley 576. 15 de febrero de 2000.
- República de Colombia. Ministerio de Medio Ambiente. Decreto 1375. 21 de junio de 2013.
- República de Colombia. Ministerio de Medio Ambiente. Decreto 1376. 27 de junio de 2013.
- República de Colombia. Presidente de la Republica. Decreto 309. 25 de febrero de 2000.

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet

- República de Colombia. Organización de las Naciones Unidas. Protocolo de Cartagena sobre seguridad en la biotecnología. Ley 165 de 1994.

- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), Organización Mundial de la Salud - OMS. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. 2002.

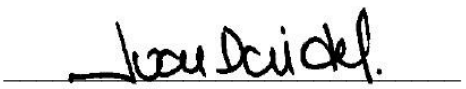
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Good Clinical Practice (GCP). Published in the Federal Register, 9 May 1997, Vol. 62, No. 90, p. 25691-25709.

- Council for International Organization of Medical Sciences, International Council for Laboratory Animal Science. Guía internacional para investigación biomédica que involucre animales. Pág. 4. 2012.

- Manila conference on animal welfare, Costa Rica steering committee meeting for ministerial conference. Universal Declaration on Animal Welfare. 2007. Pág. 2.

- Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Fecha de entrega: 18 de marzo de 2024

Firma del Investigador principal: 

icontec ISO 9001 SC5206-1 IQNet