



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**“ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA  
CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS  
MATERNAS Y FINALIZADORAS.”**

**Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Médicos Veterinarios**

**Autores:**

Camino Falcón Gabriel Alexander

Cepeda Torres Angye Daniela

**Tutora:**

Veloz Veloz Dina Maricela

**LATACUNGA – ECUADOR Julio 2025**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Camino Falcón Gabriel Alexander, con cédula de ciudadanía No. 0550186688 y Cepeda Torres Angye Daniela con cédula de ciudadanía No. 1724266026, declaramos ser autores del presente Proyecto de Investigación: **“ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS”**, siendo la Médica Veterinaria Zootecnista. Veloz Veloz Dina Maricela, Tutora del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 21 de Julio del 2025



Gabriel Alexander Camino Falcón

C.C. 0550186688

**ESTUDIANTE**



Angye Daniela Cepeda Torres

C.C. 1724266026

**ESTUDIANTE**

## **CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR**

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CAMINO FALCÓN GABRIEL ALEXANDER**, identificado con cédula de ciudadanía **0550186688** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS.”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Abril 2021 - Agosto 2021

Finalización de la carrera: Abril 2025– Agosto 2025

Tutor: MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, M. Sc.

Tema: **“ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS.”**

**CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA. -** Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.


**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.** - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 21 días del mes de Julio del 2025.

  
Gabriel Alexander Camino Falcón  
**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.  
**LA CESIONARIA**

## **CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR**

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CEPEDA TORRES ANGYE DANIELA**, identificada con cédula de ciudadanía **1724266026** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.** - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Abril 2021 - Agosto 2021

Finalización de la carrera: Abril 2025– Agosto 2025

Tutor: MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, M. Sc.

Tema: “**ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS.**”

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.** - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 21 días del mes de Julio del 2025.



Angye Daniela Cepeda Torres  
**LA CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.  
**LA CESIONARIA**

## **AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

**“ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS”**, de Camino Falcón Gabriel Alexander y Cepeda Torres Angye Daniela, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 21 de Julio del 2025



MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, MSc.

C.C:1720299302

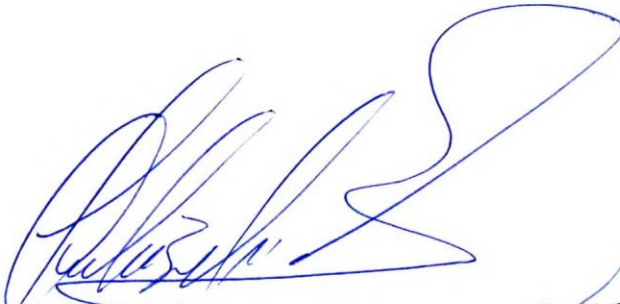
**DOCENTE TUTORA**

## AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: Camino Falcón Gabriel Alexander y Cepeda Torres Angye Daniela, con el título del Proyecto de Investigación: “ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS”, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 21 de Julio del 2025



MVZ. Cristian Beltrán Romero, Mg  
C.C: 0501942940  
**LECTOR 1 (PRESIDENTE)**



Dr. Rafael Garzón Jarrín, Ph.D  
C.C: 0501097224  
**LECTOR 2 (MIEMBRO)**



MVZ. Edie Molina Guasapaz Mtr.  
C.C:1722547278  
**LECTOR 3 (MIEMBRO)**

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco a Dios por permitirme llegar hasta este momento y acompañarme en cada paso. También a las oraciones de mi abuela Marina y mi tía Soledad, que han sido una fuente constante de fortaleza y bendición en mi vida.*

*A mis padres, Pablo Camino y Victoria Falcón, pilares inquebrantables de mi vida. No existen palabras que alcancen para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Su amor ha sido mi refugio, su ejemplo mi guía, y su sacrificio, muchas veces silencioso e invisible para el mundo, la fuerza que me sostuvo en los momentos más duros. Los admiro profundamente, no solo por lo que han hecho por mí, sino por quienes son: seres valientes, generosos, nobles, que siempre pusieron a su familia por encima de todo. Gracias por enseñarme con el corazón lo que significa la entrega, la humildad y la dignidad.*

*A mis docentes, quienes con dedicación compartieron su conocimiento y compromiso con nuestra formación. Agradezco de manera especial a la Dra. Dina Veloz, por su vocación, entrega y por ser una guía clave en mi camino académico y profesional.*

*A Angye Cepeda, mi compañera de aula y de vida, gracias por cada momento compartido, por estar a mi lado en los días buenos y en los difíciles, por reír conmigo, por aguantar silencios, por soñar y luchar juntos. Lo nuestro siempre fue más que una amistad: fue una conexión profunda, real, de esas que se sienten en el alma. Gracias por enseñarme tanto, por hacerme mejor persona, por inspirarme a seguir cuando las fuerzas flaqueaban. Hoy cumplimos una promesa que nació del cariño y del compromiso mutuo, y aunque el camino no fue fácil, lo hicimos juntos. Gracias por dejarme ser parte de tu mundo, por permitirme caminar a tu lado. Te quiero mucho, michin, y desde el fondo de mi corazón, deseo que la vida te regale siempre lo mejor.*

**Gabriel.**

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco, en primer lugar, a Dios y mis padres, Edgar Cepeda y Diana Torres, por haber sido mi sostén en cada obstáculo que se ha presentado durante este arduo camino, fueron ellos quienes me guiaron a salir adelante y me enseñaron a no rendirme fácilmente. A mi paciente estrella, mi Micho, quien fue la inspiración constante que me motivó a ir más allá, a investigar, aprender y crecer como profesional. Gracias por ser parte fundamental de este proceso.*

*Extiendo mi profundo agradecimiento a mi alma máter, y en especial a la Dra. Dina Veloz, quien no solo fue mi tutora de tesis, sino también una guía constante y un apoyo invaluable en medio de este desafiante trayecto. Su acompañamiento como tutora y docente marcó una gran diferencia en mi formación. Del mismo modo, agradezco sinceramente a los miembros de mi jurado: el Dr. Cristian Beltrán, el Dr. Rafael Garzón y el Dr. Edie Molina, quienes me han acompañado a lo largo de mi formación universitaria. Los llevo en mi corazón y los recordaré siempre como excelentes docentes y profesionales ejemplares.*

*Finalmente, a Gabriel Camino, mi mano derecha, mi compañero de vida y desde siempre, mi mayor apoyo. Desde el primer semestre has estado a mi lado, creyendo en mí incluso cuando yo dudaba. Hoy compartimos no solo este logro, sino todo lo que construimos juntos a lo largo del camino. Gracias por estar en cada caída y en cada acierto, por alentarme, por motivarme y por todo el amor que me has brindado. Este logro también es tuyo.*

**Angye.**

## ***DEDICATORIA***

*Esta tesis es el testimonio de innumerables horas de esfuerzo, dedicación y la firme convicción de alcanzar una meta. Cada página, cada línea, refleja la perseverancia que me impulsó a superar los desafíos y a crecer profesionalmente.*

*Quiero dedicar este logro, en gran medida, a mí mismo. A la disciplina que cultivé, a la curiosidad insaciable que me guio y a la pasión que descubrí y nutrí a lo largo de este camino.*

***Gabriel.***

## **DEDICATORIA**

*A ti, mamá.*

*Porque este logro es, ante todo, tuyo. Por ser mi motor, mi fuerza y mi ejemplo.*

*Por cada sacrificio, por cada desvelo, por todo el amor y la dedicación con los que me has acompañado desde siempre.*

*Gracias por forjar en mí los valores que hoy me definen, por enseñarme a luchar con valentía y a nunca rendirme. Todo lo que soy es reflejo de la mujer que me crió, y espero que este paso sea motivo de orgullo para ti.*

*Te amo.*

*Angye.*

# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

## **FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TÍTULO: “ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LÍNEAS MATERNALES Y FINALIZADORAS.”**

**Autores:**  
Camino Falcón Gabriel Alexander Cepeda  
Torres Angye Daniela

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como propósito diseñar y validar un protocolo de crioconservación de semen porcino en líneas maternas (Yorkshire) y finalizadoras (Duroc, Pietrain), a través de la evaluación de diferentes parámetros como la variabilidad espermática con los medios Androstar Plus y Cryoguard, para su posterior análisis. Se utilizaron los crioprotectores, para el análisis de nueve muestras seminales (tres por cada verraco), alcanzando la evaluación de variables. Durante la etapa de la pre congelación los valores de concentración espermática oscilaron entre 143,33 y 200 millones/mL, siendo Yorkshire la raza con mayor valor, seguida por Pietrain y luego Duroc. A nivel de la motilidad individual los individuos de cada raza alcanzaron valores Pietrain 95 %, Yorkshire 90 % y Duroc presentó valores entre 75 % y 80 %, lo que fue un reflejo de la calidad espermática encontrada. Tras la criopreservación se obtuvo una reducción significativa con 20 puntos porcentuales para un ( $p < 0.001$ ), resaltando la muestra de Duroc que descendió hasta un 60 %, siendo para Pietrain y Yorkshire valores entre 75 % y 80 %. Para la motilidad progresiva se observó de igual forma una caída en Duroc que llegó a registrar hasta un 55 %, siendo el caso contrario para Pietrain y Yorkshire con 85 %. En términos de morfología, de igual forma la raza Duroc presentó un 15 %, mientras que Pietrain y Yorkshiresolo fue del 2%. Las correlaciones arrojaron relaciones positivas en motilidad individual y progresiva ( $r = 0.88$ ), lo que representa mayor movilidad y que está directamente asociada a mejores desplazamientos, caso contrario se encontró una relación negativa entre morfología anormal y motilidad ( $r = -0.72$ ), lo que representa mayor integridad estructural del espermatozoide. Dentro de los análisis económicos se obtuvo un costo total del proceso de criopreservación fue de \$809,54, siendo por pajueta de \$4,50 y por dosis (ocho pajuelas) de \$36,00. El conjunto de resultados permite caracterizar al individuo de la raza Pietrain con mejor desempeño general.

**Palabras clave:** crioconservación, semen porcino, duroc, pietrain, calidad espermática.

**COTOPAXI TECHNICAL UNIVERSITY**  
**FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES**

**THEME: “STANDARDIZATION OF PROTOCOLS FOR THE  
CRYOPRESERVATION OF BOAR SEMEN IN MATERNAL AND FINISHING  
LINES.”**

**Authors:**  
Camino Falcón Gabriel Alexander Cepeda  
Torres Angye Daniela

## ABSTRACT

The purpose of this study was to design and validate a cryopreservation protocol for boar semen in maternal lines (Yorkshire) and finisher lines (Duroc, Pietrain), through the evaluation of different parameters such as sperm variability with Androstar Plus and Cryoguard media, for subsequent analysis. The cryoprotectants were used to analysis nine semen samples (three for each boar), achieving the evaluation of variables such as progressive motility, individual motility, pH concentration, and sperm morphology. During the pre-freezing stage, sperm concentration values ranged between 143.33 and 200 million/mL, with Yorkshire being the breed with the highest value, followed by Pietrain and then Duroc. At the level of individual motility, individuals of each breed reached Pietrain values of 95%, Yorkshire 90%, and Duroc presented values between 75% and 80%, which was a reflection of the sperm quality found. After cryopreservation, a significant reduction of 20 percentage points was observed ( $p < 0.001$ ), highlighting the Duroc sample dropped up 60%, with values for Pietrain and Yorkshire between 75% and 80%. For progressive motility, a drop was also observed in Duroc, reaching up to 55%, the opposite being the case for Pietrain and Yorkshire with 85%. In terms of morphology, Duroc breed also presented 15%, while Pietrain and Yorkshire only 2%. Correlations showed positive relationships in individual and progressive motility ( $r = 0.88$ ), which represents greater mobility directly associated with better movements, contrary to the case, a negative relationship was found between abnormal morphology and motility ( $r = -0.72$ ), which represents greater structural integrity of the sperm. Within the economic analyses, a total cost of cryopreservation process was \$ 809.54, being \$ 4.50 per straw and \$ 36.00 per dose (eight straws). The set of results allows to characterize Pietrain breed individual with the best overall performance in post-freezing processes.

**Keywords:** cryopreservation, boar semen, duroc, pietrain, sperm quality.

## ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR .....	iii

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR .....	v	
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	vii	
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN .....	viii	
AGRADECIMIENTO .....	ix	
AGRADECIMIENTO .....	x	
DEDICATORIA .....		xi
DEDICATORIA .....	xii	
RESUMEN .....		xiii
ABSTRACT .....	xiv	
1. INFORMACIÓN GENERAL .....	1	
2. JUSTIFICACIÓN.....	1	
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO .....	2	
3.1. Directos .....	2	
3.2. Indirectos .....	2	
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2	
5. OBJETIVOS.....	3	
5.1. Objetivo General .....	3	
5.2. Objetivos específicos .....	3	
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS .....	4	
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA .....	5	
7.1. Porcicultura .....	5	
7.2. Sistema reproductivo del cerdo y su desarrollo testicular .....	5	
7.3. Extracción de semen .....	6	
7.3.1. Método manual .....	6	
7.3.2. Uso de maniquí .....	6	
7.3.3. Vagina artificial. ....	6	
7.4. Evaluación espermática .....	6	
7.4.1. Evaluación macroscópica .....	6	

7.4.1.1.	Volumen .....	6
7.4.1.2.	Aspecto .....	7
7.4.1.3.	Olor.....	7
7.4.1.4.	pH .....	8
7.4.2.	Evaluación microscópica .....	8
7.4.2.1.	Motilidad espermática .....	8
7.4.2.2.	Motilidad masal .....	9
7.4.2.3.	Motilidad individual .....	9
7.4.2.4.	Vigor.....	9
7.4.2.5.	Morfología espermática.....	9
7.4.2.6.	Concentración espermática .....	11
7.4.3.	Evaluación con CASA (Análisis de semen asistido con computadora) .....	11
7.5.	Diluyente .....	12
7.5.1.	Funciones del diluyente .....	12
7.6.	Crio preservación del semen .....	12
7.7.	Crioprotectores .....	12
7.7.1.	Androstar plus .....	13
7.7.2.	CryoGuard Part A: diluyente de enfriamiento .....	13
7.7.3.	CryoGuard Part B: crioprotector para la congelación .....	14
7.7.4.	CryoGuard Thaw: Medio de descongelación .....	14
7.8.	Costos .....	14
8.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS .....	15
9.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	15
9.1.	Área de estudio .....	15
9.2.	Materiales y equipos .....	16
9.2.1.	Biológicos .....	16
9.2.2.	Químicos .....	16
9.2.3.	De oficina .....	16

9.2.4.	De laboratorio .....	16
9.3.	Grupo de estudio .....	17
9.4.	Variable de estudio .....	18
9.4.1.	Variable independiente: .....	18
9.4.2.	Variables dependientes: .....	18
9.4.3.	Variables de control .....	18
9.5.	Preparación de Androstar plus .....	18
9.6.	Colecta seminal .....	18
9.7.	Evaluación de semen diluido .....	19
9.7.1.	Macroscópica .....	19
9.7.2.	Microscópica .....	19
9.7.2.1.	Motilidad individual .....	19
9.7.2.2.	Motilidad progresiva .....	19
9.7.2.3.	Concentración .....	20
9.7.2.4.	Vigor .....	20
9.7.2.5.	Morfología .....	20
9.8.	Preparación de diluyentes .....	20
9.8.1.	Crioprotector de enfriamiento CryoGuard part A (cryoguard par A+ agua bidestilada+ yema de huevo + pellet) .....	20
9.8.2.	Crioprotector de congelación CryoGuard part B (cryoguard part B+ agua bidestilada+ yema de huevo+ dilución de cryoguard par A) .....	21
9.9.	Preparación y evaluación de pajuelas .....	21
9.9.1.	Motilidad individual .....	22
9.9.2.	Motilidad progresiva .....	22
9.10.	Costos de producción .....	22
10.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	22
10.1.	Evaluar la viabilidad espermática con Androstar .....	22
10.2.	Calcular el costo de producción por dosis seminal criopreservadas. ....	29
10.3.	Resultados principales .....	30

11.	IMPACTOS TÉCNICOS SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS .....	30
11.1.	Impacto técnico .....	30
11.2.	Impacto económico .....	30
11.3.	Impacto social .....	31
11.4.	Impacto ambiental .....	31
12.	PRESUPUESTO DEL PROYECTO .....	31
13.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	34
13.1.	Conclusiones .....	34
13.2.	Recomendaciones .....	35
14.	BIBLIOGRAFÍA .....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Actividades y resultados de la investigación en relación a los objetivos planteados.....	4
<b>Tabla 2</b>	Razas seleccionadas para el estudio .....	18
<b>Tabla 3</b>	Evaluación seminal pre-congelación.....	23
<b>Tabla 4</b>	Promedio de concentración espermática .....	27
<b>Tabla 5</b>	Evaluación seminal descongelado.....	28
<b>Tabla 6</b>	Total de costos de producción .....	30
<b>Tabla 7</b>	Costo estimado unitario por pajueta y dosis.....	30
<b>Tabla 8</b>	Instrumentos electrónicos.....	32
<b>Tabla 9</b>	Elementos de oficina .....	33
<b>Tabla 10</b>	Gastos fijos .....	33
<b>Tabla 11</b>	Insumos de laboratorio .....	33
<b>Tabla 12</b>	Reactivos y Crioprotectores .....	34

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Anatomía del espermatozoide (36). .....	10
Figura 2	Alteraciones morfológicas de los espermatozoides (38). .....	11
Figura 3	Mapa de la parroquia San Miguelito de Píllaro .....	16

## INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1 Matriz de correlación entre los parámetros seminales. ....	25
Gráfico 2 Matriz de variabilidad de concentración espermática .....	26
Gráfico 3 Comparación de motilidad individual .....	28



## **1. INFORMACIÓN GENERAL**

### **Título del Proyecto:**

Estandarización de protocolo para crioconservación de semen porcino en líneas maternas y finalizadoras **Fecha de inicio:**

Febrero 2025

### **Fecha de finalización:**

Agosto 2025

### **Lugar de ejecución:**

Barrio San Miguelito de Píllaro

### **Unidad Académica que auspicia:**

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (CAREN) **Carrera**

### **que auspicia:**

Medicina Veterinaria

### **Proyecto de investigación vinculado:**

Recursos zoo genéticos, desarrollo de biotecnologías y preservación de material genético.

### **Equipo de Trabajo:**

**Tutor/a:** MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela (Anexo 1)

**Estudiantes:** Camino Falcón Gabriel Alexander y Cepeda Torres Angye Daniela (Anexo 2)

### **Coordinador de proyecto:**

### **Área de Conocimiento:**

Ciencias Agrarias, Ciencias Veterinarias, Genética **Subárea:**

Veterinaria.

### **Línea de investigación:**

Producción y biotecnología animal.

### **Sub líneas de investigación de la Carrera:**

Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoo genéticos.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En el Ecuador se producen 206,000 mil toneladas de carne de cerdo al año que abastece el consumo per cápita de las y los ecuatorianos que es de 11 kg anuales, incluso exporta a distintos países entre ellos Vietnam y Costa de Marfil en 2024 se envió 57,2 toneladas a estos dos países, dando un rédito económico y social de 600 millones de dólares y generando alrededor de 80 mil empleos directos y más de 200 mil indirectos representando en la actualidad el 8% del PIB agropecuario del país. Esta propuesta responde a la creciente demanda del

mercado porcícola para mejorar características deseables y transmisibles para la producción de carne (1).

La presente investigación surge de la imperante necesidad de desarrollar y estandarizar protocolos de criopreservación de semen porcino para líneas maternas y finalizadoras. La aplicación de la criopreservación de semen representa un avance significativo en la biotecnología reproductiva porcina. Esta técnica no solo permitirá la preservación indefinida de material genético, sino que también facilitará la diversificación de razas en nuestro país, incluyendo la valiosa conservación de razas criollas.

Desde una perspectiva práctica esta investigación aportará en la disminución de la versatilidad técnica impulsando las tasas de fertilidad mediante el uso de una metodología replicable y facilitada, mientras que desde un punto teórico contribuirá bases de información valiosa para futuras investigaciones relacionadas con la biología espermática y los efectos de crioprotectores en relación a la conservación genética. En términos generales, el propósito de esta investigación se proyecta en perfeccionar el uso de técnicas biotecnológicas como lo es la congelación de semen porcino para fortalecer la productividad y maximizar el potencial de cada verraco generando así plantales porcícolas con animales más eficientes y sostenibles.

### **3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

#### **3.1. Directos**

- Productores porcinos a nivel nacional.
- Investigadores de proyecto

#### **3.2. Indirectos**

- Instituciones académicas y de investigación
- Estudiantes medicina veterinaria y profesionales a fin

El alcance e impacto de este proyecto son amplios y trascendentes, beneficiando tanto a los actores directos como a los indirectos dentro de la cadena de valor de la porcícola. Desde la investigación y el desarrollo hasta la producción y el consumo final, la optimización de las técnicas de criopreservación y reproducción asistida fomentará la sostenibilidad, mejorará la eficiencia y contribuirá a la diversificación genética del sector porcino, fortaleciendo así su competitividad y resiliencia a largo plazo

### **4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

A lo largo del tiempo las técnicas de reproducción mayormente utilizadas en la industria porcina han sido enfocadas a la eficiencia productiva, optimización de rasgos genéticos y la disminución de enfermedades reproductivas infecciosas. La implementación de estas

biotecnologías enfrenta distintos desafíos, uno de los principales problemas es la falta de capacitación y desconocimiento de protocolos de preservación genética a largo plazo como la crioconservación de semen porcino, la cual es una herramienta muy útil en la reproducción asistida, ya que permite la preservación por tiempos prolongados de material genético y la distribución a largas distancias. La crio congelación permite la incorporación de bancos seminales de interés relevante en el caso de la preservación de razas endémicas o en peligro de extinción, también de líneas especializadas en su característica productiva.

Otro factor relevante, es el limitado acceso a material de alta calidad como el semen congelado de alto valor genético. En muchas provincias del país la adquisición de material genético se ve afectado debido a costos elevados y problemas de importación, lo que orilla a los porcicultores minoristas y mayoristas a depender de material genético nacional que presenta menor valor genético. esto conlleva directamente a la calidad y productividad de la canal e indirectamente a la diseminación de patologías infecciosas con el uso de ejemplares mediante monta natural.

Así mismo las condiciones infraestructurales de múltiples unidades productivas y de laboratorios no son las óptimas, y a su vez, hay poco interés de aplicar estos crioprotectores en el país para la congelación de semen porcino.

A esto se le suma el rechazo por parte de los porcicultores debido a tradiciones como la monta natural y la desconfianza de la efectividad en estas biotecnologías. Esta oposición al cambio impide la modernización e impulso del sector porcícola y retrasa los beneficios que podrían adquirir en términos de mejora genética, productiva, reproductiva y reducción de costos por mantenimiento de verracos (2).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

- Estandarizar un protocolo para la crioconservación de semen porcino en líneas maternas y finalizadoras, optimizando las tasas de viabilidad espermática y su funcionalidad postcongelación en condiciones locales.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la viabilidad espermática con Androstar Plus
- Comparar los resultados pre-congelación y post-descongelación de dosis seminales porcinas
- Calcular el costo de producción por dosis seminal crio preservadas.

## 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

*Tabla 1 Actividades y resultados de la investigación en relación a los objetivos planteados.*

<b>Objetivo 1</b>	<b>Actividad</b>	<b>Resultado de la actividad</b>	<b>Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)</b>
Evaluar la viabilidad espermática con Androstar.	Evaluar el eyaculado obtenidos	Analizar los parámetros establecidos para la evaluación de semen porcino.	Visualización con microscopio para evaluar calidad seminal.
<b>Objetivo 2</b>	<b>Actividad</b>	<b>Resultado de la actividad</b>	<b>Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)</b>
Comparar los resultados pre-congelación y postdescongelación de dosis seminales porcinas	Evaluar las muestras pre y post descongelación Comparar resultados de ambas fases.	Observar cambios en los resultados de las muestras postdescongelación.	Analizar los datos mediante Software estadísticos R estudio, representándolos con gráficos de dispersión, caja y bigotes.
<b>Objetivo 3</b>	<b>Actividad</b>	<b>Resultado de la actividad</b>	<b>Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)</b>
Calcular el costo de producción por dosis seminal congelada.	Tabular los costos de producción. Determinar el costo de producción individual de cada pajuela.	Establecer diferencias de costos de producción entre distintas biotecnologías reproductivas.	Clasificar los costos de producción fijos y variables mediante el uso de Excel. Dividir los costos de producción totales por el número de pajuelas

## **7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA**

### **7.1. Porcicultura**

La porcicultura en Ecuador se ha conformado como uno de los pilares indispensables para la producción pecuaria del país. en los últimos años, en gran medida, gracias a la zootecnia y tecnificación que ha incrementado los valores de eficiencia. Hoy en día la industria porcícola no solo se complace con la demanda per cápita del país, si no también realiza exportaciones a múltiples mercados internacionales debido a la oferta de carne de excelente calidad.

Esto, obedece al acelerado crecimiento de la producción de carne porcina incrementando en un 134% la producción de carne en la última década y media y un 5% en el último año (3).

Realmente son cifras alentadoras debido a que en el país se ha venido realizando diversas investigaciones acerca de la productividad y mejora genética de distintas líneas nacionales y extranjeras, sin embargo aún existe el desconocimiento de técnicas o protocolos poco utilizados como la criopreservación de semen porcino es una técnica poco utilizada debido a su bajo estudio en relación al ganado bovino pero está no es una técnica nueva ya que las primeras cerdas inseminadas con semen descongelado datan desde el año 1969 (4).

Se debe saber que existen diferencias muy marcadas entre el semen porcino en comparación a otras especies y su sensibilidad a cambios considerables en su viabilidad al exponerlos a temperaturas menores a los 15°C es un factor a considerar en esta técnica. Para ello es fundamental conocer las características anatómicas y fisiológicas del tracto reproductivo de los animales (5).

### **7.2. Sistema reproductivo del cerdo y su desarrollo testicular**

La estructura del sistema reproductor porcino está dedicada a la producción, almacenamiento y movimiento de espermatozoides y consta de los testículos, epidídimo, varios conductos espermáticos, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales y el pene. Los testículos son los órganos donde se producen el esperma y la testosterona y están situados fuera del cuerpo en el escroto (6). Es aquí donde ocurre la espermatogénesis, la creación de esperma. Mediante divisiones mitóticas, dos divisiones meióticas y una posterior transformación celular que deriva en gametos funcionales, listos para la fecundación. Su correcta ejecución depende del adecuado ambiente testicular, niveles hormonales, expresión génica y estabilidad epigenética (7).

Según el trabajo de Barzola Flores (2022), “el desarrollo testicular y la calidad seminal están influenciados por la genética, el manejo, la nutrición y el entorno térmico en el que se

encuentre el animal” (p. 24). Esto demuestra que para obtener un semen de calidad y optimizar su preservación, es esencial considerar todo el contexto fisiológico y ambiental del animal.

### **7.3. Extracción de semen**

La recolección de semen puede realizarse con varias técnicas y aunque cada una presente sus ventajas también conllevan limitaciones y requerimientos (8).

#### **7.3.1. Método manual**

Esta técnica es la más usada en la recolección seminal debido a lo económica y sencilla que es. Consiste en estimular al ejemplar durante la eyaculación usando guantes y un frasco recolector estéril. Aunque no requiere equipo complejo ni limpieza intensiva, esta técnica puede no inducir la máxima liberación de espermatozoides comparado con técnicas más avanzadas (9).

#### **7.3.2. Uso de maniquí**

Un maniquí proporciona estímulo visual al ejemplar, además de comodidad sin requerir una hembra real, existen versiones rústicas y otras más especializadas que controlan la temperatura, presión, higiene, reducen carga bacteriana y mejoran eficiencia operativa. La limpieza del maniquí antes y después de su uso es fundamental, además de un correcto posicionamiento del maniquí considerando la altura del animal, condición corporal u otros factores (10). Esta técnica es usada en criaderos que entrenan a los ejemplares desde temprana edad para que monte el maniquí y usando los mismos materiales como guantes y frasco estéril extrae el semen (11).

#### **7.3.3. Vagina artificial.**

Esta técnica costosa es muy eficaz, ya que simula condiciones similares a una vagina real, como temperatura, presión, lubricación y es gracias a esto que se consigue una eyaculación más completa del verraco. Está compuesta de un cuerpo rígido con funda interna estéril y calentada a 40°C, filtro y embudo colector que garantiza no derramar el eyaculado (12).

### **7.4. Evaluación espermática**

Posterior a la extracción del material seminal de los ejemplares se realiza la evaluación del semen colectado y se lo realiza en dos fases, primero de manera general o macroscópica y segundo de forma más detallada o microscópica. En ambas se debe tomar en cuenta múltiples parámetros (13). La evaluación macroscópica consiste en la visualización y medición de características como: volumen, aspecto, olor y ph.

### **7.4.1. Evaluación macroscópica**

#### **7.4.1.1. Volumen**

El volumen puede variar dependiendo la edad, una vez que los sujetos alcanzan la pubertad que oscila entre los seis y ocho meses, el sistema reproductivo de los especímenes empieza a elevar la producción de células productoras de esperma y la relación del volumen espermático al agrandamiento de los testículos hasta que el verraco alcanza los 18 meses edad en donde llega a su madurez sexual. En verracos de igual o similar a este tiempo suele presentarse eyaculados entre los 100 y 300 ml (14).

En verracos adultos, el volumen del eyaculado suele oscilar entre 150 y 600 ml, aunque se han reportado valores extremos que alcanzan hasta 1200 ml. Las variaciones se explican por la edad, rutinaria de colecta, genética y condiciones de manejo. Respecto a la edad óptima para la reproducción, estudios señalan que los verracos alcanzan su pico de producción seminal entre los 2 y 3,5 años, tras lo cual la eficiencia puede descender gradualmente (15).

El proceso del eyaculado en el ganado porcino lo realiza en tres fracciones:

Fracción pre-espermática: está formada por líquidos producidos por la próstata, las vesículas seminales y en parte por las glándulas de Cowper. Es un fluido claro, no contiene espermatozoides y representa entre el 5 y el 20% del total del eyaculado. Su función principal es preparar la uretra para el paso del semen (15).

Fracción espermática: esta se compone sobre todo de espermatozoides, junto con secreciones de la próstata y las vesículas seminales. Su volumen varía entre 40 y 100 ml, lo que equivale aproximadamente al 30–50% del total eyaculado (16).

Fracción post-espermática: tiene una baja concentración de espermatozoides y está compuesta sobre todo por secreciones de las glándulas de Cowper y la próstata. Su consistencia suele ser gelatinosa y su volumen se aproxima a los 200 ml, lo que equivale entre el 40 y el 60% del total eyaculado (17).

#### **7.4.1.2. Aspecto**

El semen porcino se caracteriza por su apariencia blanco opalescente, en ocasiones con reflejos azulados; tonalidades amarillentas o turbias pueden sugerir alteraciones metabólicas o procesos infecciosos (18). El color del semen porcino está directamente relacionada a la fracción del eyaculado y la concentración espermática ya que si la concentración está en parámetros óptimos o elevados este se tornará blanco lechoso, de lo contrario si este eyaculado está en una tonalidad blanca acuosa pues se lo adjudica a una pobre concentración espermática (19).

#### **7.4.1.3. Olor**

Una de las limitantes que garantizan una buena extracción de una muestra seminal es la ausencia de olores fuertes o fétidos en la misma. Este tipo de contaminación está relacionado a fracciones del divertículo prepucial el cual es un órgano bilobulado en donde se albergan restos de material seminal y orina al no tener una buena higiene de los especímenes (20).

#### **7.4.1.4. pH**

El pH está levemente desplazado hacia la alcalinidad, típicamente entre 7,2 y 7,8, lo cual favorece la motilidad espermática; desviaciones importantes pueden reflejar disfunción en glándulas accesorias (21).

El papel del pH es fundamental para la viabilidad de las muestras seminales frescas, diluidas y criogenizadas, ya que se ha visto involucrado en actividades espermáticas vitales como la motilidad individual, motilidad progresiva y a su vez está inmerso en alteraciones morfológicas, esto porque los espermatozoides de los porcinos no toleran los medios ácidos (22).

### **7.4.2. Evaluación microscópica**

Este parámetro es vital ya que proporciona una vista panorámica y directa de la capacidad fértil del verraco y su vida reproductiva, mediante la concentración espermática se visualiza el número de espermatozoides por cada ml de eyaculado o del eyaculado en general por fórmulas que facilitan un aproximado por medio de un método manual como la cámara de Neubauer o un método automático computarizado (CASA) y otros más precisos como la citometría de flujo (23). A continuación, se presentan los procedimientos mencionados:

#### **7.4.2.1. Motilidad espermática**

El número de espermatozoides que se mueven y avanzan de forma progresiva está determinado por su motilidad. Esta característica individual es clave para evaluar la capacidad fecundante de una muestra de semen en condiciones naturales, y se ha comprobado que guarda una relación positiva con la fertilidad en los cerdos. Tanto la motilidad como la viabilidad de los espermatozoides están ligadas a una secreción adecuada y equilibrada por parte de las vesículas seminales y la próstata (24).

Los fluidos de las vesículas seminales incluyen sustancias que afectan negativamente la motilidad espermática. Además, la secreción prostática alberga sustancias que activan la motilidad y, al mezclarse con los espermatozoides, los protegen de los efectos perjudiciales de la secreción de las vesículas seminales (25).

El desplazamiento normal de los espermatozoides es en línea recta, en una sola dirección, con avance progresivo y rápidos movimientos de la cola. Este tipo de movilidad se asocia con mayor fertilidad, y se considera que un eyaculado es de buena calidad si al menos el 80% de los espermatozoides se mueven de forma progresiva. También existen movimientos anormales, como giros, temblores o desplazamiento hacia atrás, los cuales están relacionados con una menor capacidad fértil (24).

#### **7.4.2.2. Motilidad masal**

La motilidad masal se refiere al porcentaje de espermatozoides que muestran algún tipo de movimiento, al cual se le asigna un valor aproximado. Esta técnica ha sido usada desde hace mucho tiempo como un método rápido para estimar la concentración y viabilidad del semen, aunque presenta cierto grado de subjetividad en su aplicación (26).

Este tipo de movimiento depende de tres factores principales: la cantidad de espermatozoides por unidad de volumen, el porcentaje con desplazamiento progresivo y la velocidad a la que se mueven. Si alguno de estos disminuye, las ondas en forma de remolino que normalmente se observan bajo el microscopio se reducen significativamente o desaparecen por completo (27).

#### **7.4.2.3. Motilidad individual**

La motilidad individual evalúa la capacidad de realizar cualquier movimiento sea erráticos o no y se puede visualizar transiciones en remolino, zig-zag, vibraciones y otros. Una motilidad individual del 70% es aceptable y del 80% es óptima, resultados menores a estos, son considerados de baja viabilidad (28).

#### **7.4.2.4. Vigor**

El vigor es una calificación que se puede dar en relación a la energía, velocidad, fuerza de los movimientos de las células, por lo general se los otorga en la motilidad progresiva. Hay distintas formas de evaluar, que puede ir del 1 al 10 o del 1 al 5, al ser subjetiva no tiene mucha relevancia. Sin embargo, cuando sí se va a congelar semen esta puntuación es un factor a tomar en cuenta para calcular dosis de crioprotectores (29).

#### **7.4.2.5. Morfología espermática**

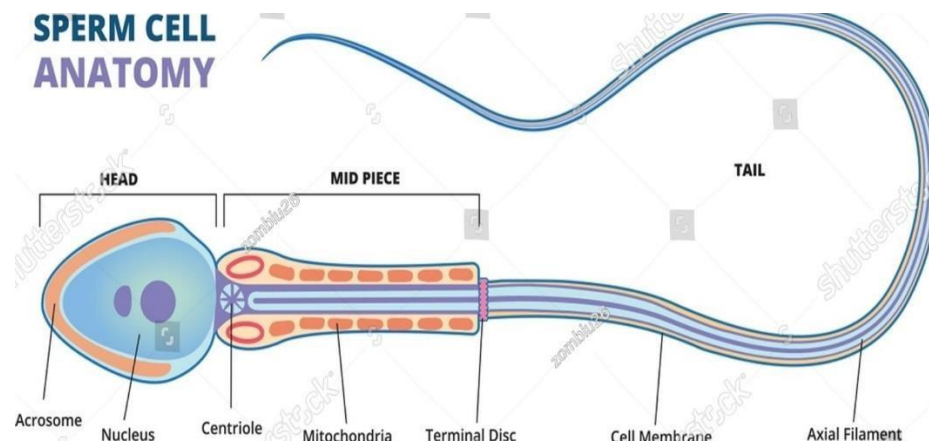
Al igual que la concentración espermática la morfología es una medida esencial para la viabilidad de los espermatozoides y capacidad fecundativa del mismo, se puede realizar mediante tinciones de eosina y nigrosina con visualización en microscopio de inmersión, con sistemas más sofisticados como el CASA, espectrofotometría o de formas más lúcida como la citometría de flujo (30).

El objetivo es determinar el porcentaje de espermatozoides normales y anormales que puedan llegar a comprometer la capacidad reproductiva y así descartar animales que no sean deseables para las prácticas biotecnológicas como la criopreservación o inseminación artificial de semen porcino (31).

Con métodos simples como tinciones de eosina y nigrosina que consiste en realizar un frotis seminal para luego colocar 10 microlitros de eosina, esperar hasta que seque y lavar, para luego pasarlo por nigrosina, lavar el excedente y esperar que seque en una platina a 37° (32) y así evaluar estructuras como: Cabeza, cuerpo, colas y gotas citoplasmáticas. Y en métodos más sofisticados como el CASA o citometría de flujo que evalúan estructuras más profundas como salud de membranas o acrosomas (33).

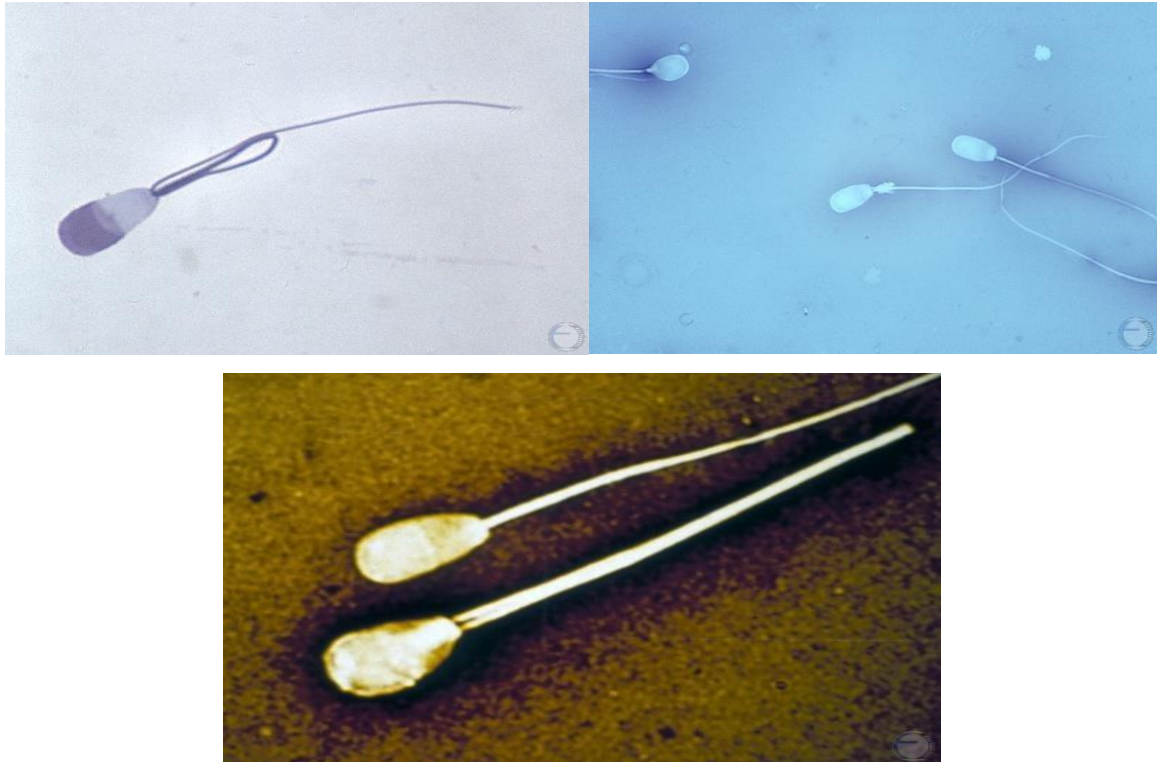
La estructura del espermatozoide está conformada por cabeza, parte media y cola y cada una cumple una función indispensable tanto para la concepción y la vida del espermatozoide.

La cabeza o acrosoma en su parte interna se encuentra todo el material genético y en su parte externa presenta enzimas que ayudan a la penetración del óvulo (34,35). La cola del espermatozoide o flagelo está conformada por tres partes: cuello, parte media y punta. En la parte media se encuentra la carga mitocondrial en donde se genera el ATP el cual proporciona la energía y vigor para el desplazamiento del espermatozoide (Ilustración 1).



**Figura 1 Anatomía del espermatozoide (36).**

Cuando se evalúa morfología espermática (Ilustración 2) se puede llegar a presenciar con ciertas anomalías en las estructuras mencionadas entre las más comunes están anomalías en cabeza, cola y gota citoplasmática como: cabeza bífida, doble flagelo, cabezas punta de alfiler, macrocefalia, microcefalia, flagelo enrollado y otros. Estos defectos mayormente son adjudicados a mala alimentación, infecciones del tracto urogenital o mal manejo de las muestras (37).



*Figura 2 Alteraciones morfológicas de los espermatozoides (38).*

#### **7.4.2.6 Concentración espermática**

La evaluación con cámara de Neubauer busca determinar la concentración espermática mediante el conteo de células y su posterior formulación. Se realiza con el uso de una placa de vidrio que tiene una rejilla grabada que puede estar conformada por 5 recuadros grandes y en cada uno de estos contiene de 16 a 25 rejillas aún más pequeñas (23).

Se realiza mediante la dilución de la muestra en proporciones de 1:100 o 1:200, utilizando agua destilada o formol para inmovilizar los espermatozoides (37). Después se coloca un cubreobjetos encima de la rejilla para posteriormente colocar 10 microlitros de esta dilución entre el espacio de la rejilla y el cubreobjetos, luego mediante los objetivos del microscopio se cuenta las células una por una en al menos 4 recuadros para luego sumar el total y se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (millones/mL)} = (\text{Conteo total} / \text{Cuadros contados}) \times \text{Dilución} \times 10^4$$

#### **7.4.3. Evaluación con CASA (Análisis de semen asistido con computadora)**

A diferencia del método manual es más rápido y eficaz, aunque tiene un valor económico mucho mayor, este proporciona datos más específicos. Además, proporciona muchos más datos como la motilidad progresiva e individual, velocidad y morfologías (39).

Para desarrollar este procedimiento se aplica una fracción de la muestra pura o diluida en un portaobjetos maker o leja precalentada evitando contaminación y formación de burbujas

en la misma. Posteriormente el sistema se encarga de enfocar y evaluar de forma automática cuadro por cuadro a cada espermatozoide y entregar los resultados en millones/ mL con una alta precisión y material gráfico adicional (40).

### **7.5. Diluyente**

Un diluyente es un medio acuoso que se puede utilizar para aumentar el volumen del eyaculado, mientras se mantienen las propiedades funcionales de los espermatozoides y se proporciona un nivel aceptable de fertilidad. La preservación in vitro del semen de cerdo puede ser líquida o congelada (41). Sin embargo, el uso de semen congelado sigue siendo muy limitado en comparación con el semen fresco diluido, principalmente debido a su baja fertilidad, que es causada por su sensibilidad al enfriamiento (42).

#### **7.5.1. Funciones del diluyente**

Se puede decir que la característica más importante respecto a los diluyentes es que mantienen la célula espermática lo más viable posible durante un cierto tiempo (19). Según su composición genérica, los diluyentes deben tener las siguientes funciones:

- Suministrar energía para el metabolismo de los espermatozoides
- Neutralizar de desechos metabólicos
- Equilibrio osmótico
- Estabilización la membrana espermática (42).

### **7.6. Crio preservación del semen**

La criopreservación de esperma consiste en enfriar el esperma a temperaturas frías (80°C y -196°C) para su almacenamiento en nitrógeno líquido. Siguiendo este procedimiento, si los espermatozoides son capaces de sobrevivir tanto a la criopreservación como a la descongelación, su integridad, una vez congelados en nitrógeno líquido, puede preservarse indefinidamente (43). La criopreservación de semen es una de las primeras biotecnologías en reproducción y ha permitido el intercambio mundial de material genético de animales con alto potencial de producción. Además, el uso de semen congelado ayuda a controlar la transferencia de enfermedades, no hay limitaciones debido a distancias geográficas y no hay restricciones de tiempo cuando se trata de preservar el germoplasma animal (44) (45).

### **7.7. Crioprotectores**

En este proceso se utilizan diluyentes como Androstar plus y Cryoguard que se diluyen en soluciones estériles como agua bidestilada más el agregado de yema de huevo. Minitube determinó que el uso de CASA da mejores resultados visualización y menor variabilidad en el resultado de las muestras. Así que mediante estas tecnologías es cómo se evalúa el material eyaculado antes de la congelación y después de la congelación (46). También al mejorar la

calidad, sellado y sistemas de identificación mediante colores y uso de códigos QR en las pajillas indicó menos variabilidad y pérdida en las muestras (47) (45).

### **7.7.1. Androstar plus**

Androstar plus es una técnica básica que busca mantener la viabilidad y funcionalidad espermática que oscila entre +5 °C y +20 °C sin llegar aún a la congelación del material espermático (48).

La motilidad progresiva y la integridad de membrana se mantienen estables aproximadamente durante 7 días, y en condiciones óptimas hasta 14 días. El pico de viabilidad se encuentra entre 3 y 7 días después de recolectado, con motilidad total superior al 80 % y una alta viabilidad membranal. Luego de este tiempo las características osmóticas de la membrana se ven comprometidas (49,50).

Se lleva a cabo la dilución con Androstar Plus que está diseñado específicamente para verracos. Este extensor líquido sintético de larga duración está compuesto de un sistema amortiguador de pH (+10 °C a +25 °C) que evita la acidificación del eyaculado; Antioxidantes que minimizan el estrés oxidativo que ocurre en la refrigeración y almacenamiento, favoreciendo la motilidad progresiva durante un tiempo más prolongado ya que neutralizan los radicales libres asegurando la integridad de la membrana plasmática, mitocondrias y ADN espermático e incluso prolongando su deterioro celular; Estabilizadores de membrana (Cell Shield Protection, CSP®) que protegen a la membrana plasmática de bajas temperaturas, cambios osmóticos y vibraciones indeseadas; y opcionalmente un suplemento bactericida orgánico (OBS), este agente natural alternativo permite reducir hasta el 50% de las dosis de antibióticos manteniendo su eficacia contra bacterias que se presentan comúnmente en el esperma porcino y a su vez, evitando resistencia bacteriana (51).

### **7.7.2. CryoGuard Part A: diluyente de enfriamiento**

El CryoGuard part A es de origen químico y biológico usados para cuidar de los espermatozoides durante las tres etapas que conlleva la crio preservación de semen: fase de enfriamiento, fase de congelación y fase de descongelación. Los protectores de esperma a la congelación trabajan reemplazando al agua de forma parcial para evitar la formación de cristales. También actúan como amortiguadores del estrés osmótico, son antioxidantes, bactericidas y regulan los niveles de pH mediante sustancias buffer (52), (53).

La yema de huevo brinda una barrera protectora óptima sobre la envoltura celular del espermatozoide haciendo frente al estrés osmótico y reducción de viabilidad de membrana que se ven afectados cuando bajan las temperaturas. La inclusión de antibióticos a este medio es

una medida de prevención a ciertos patógenos de origen bacteriano que puedan llegar a invadir la muestra antes, durante y después de este proceso y así evitar alteraciones y disminución en la calidad de la muestra (54).

### **7.7.3. CryoGuard Part B: crioprotector para la congelación**

CryoGuard Part B es el crioprotector principal para el proceso de congelación con el uso de nitrógeno líquido. Está compuesto de glicerol como el cual actúa sustituyendo parte del agua intracelular y así evita en gran medida la creación de cristales adentro de la célula que puede llegar a lesionar la integridad intracelular de los espermatozoides. Además, el uso de sustancias como el Equex STM, derivado del detergente Orvus ES Paste que ayuden a la tensión provocada por la congelación y así evitar la arrugas, zonas rígidas y fístulas que puedan provocar la ruptura de la membrana y en combinación con el glicerol aportan características antioxidantes (53).

### **7.7.4. CryoGuard Thaw: Medio de descongelación**

El CryoGuard Thaw involucrado en la fase de descongelación y ayuda a la recuperación del espermatozoide brindando un medio compuesto por azúcares como glucosa, fructosa, lactosa brindando energía para la recuperación del movimiento de los espermatozoides y a su vez algunos azúcares como la trehalosa previenen el choque osmótico y soluciones buffer entre ellas fosfato de sodio, bicarbonato de sodio, HEPES y demás que ayudan a la regulación del pH debido a los efectos negativos que la descongelación por la liberación de iones (55). Sin estas sustancias, podría comprometer proteínas que llegaría a dañar la membrana. También contiene electrolitos como: cloruro de (sodio, potasio y calcio) que ayuda a incorporar la homeostasis iónico del espacio extracelular.

El calcio es individualmente relevante ya que interviene en la reactivación del movimiento espermático. Además, el  $\text{NaHCO}_3$  además de ser una sustancia buffer, también activa la enzima relacionada con funciones del movimiento (56).

La presencia de antioxidantes es vital para la descongelación puesto que durante este proceso las células espermáticas elaboran reactivos de oxígeno que a la larga oxidan la membrana, para evitar estas complicaciones interviene el glutatión que mantiene estable la integridad mitocondrial, la catalasa es una enzima degrada los superóxidos y peróxido de hidrógeno (57).

## **7.8. Costos**

Los técnicos de inseminación que cuentan con una tecnificación media-alta que no requieren de una inversión en los equipos necesarios para la replicación del protocolo de minitube disponen de una ventaja significativa a comparación de técnicos con escaso grado de tecnificación debido a que la precisión del desarrollo se vería afectado ya que los instrumentos

básicos como el tanque de crioconservación, centrifugadora, refrigerada y microscopio son herramientas indispensables. Y a la vez reflejando la mayor inversión para el establecimiento de esta práctica.

Por otro lado, remitiéndose al costo de los reactivos conformado por diluyente de mantenimiento, crio protectores y diluyente de descongelación ronda los 380\$, valor de mercado actual que pueden rendir hasta un litro de solución en comparación con la refrigeración seminal el costo de los diluyentes son más bajos, se estima entre los 15 hasta los 50\$ y aunque tienen un rendimiento similar en relación a volumen carece del mismo tiempo y conservación de la muestra.

Finalmente, luego de la revisión y contribuciones teóricas expuestas brinda un punto de partida sólido que facilita la comprensión del propósito de la indagación y análisis de este proyecto desde un enfoque más integral, se procede a describir de forma sistemática y basada en las recomendaciones de la misma empresa el desarrollo del protocolo de criopreservación de semen porcino patentado por parte de la empresa Minitube.

## **8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS**

H1: El semen criopreservado con CryoGuard mantiene la capacidad fecundativa de los espermatozoides aceptables para su fertilidad en cerdos de líneas maternas y finalizadoras

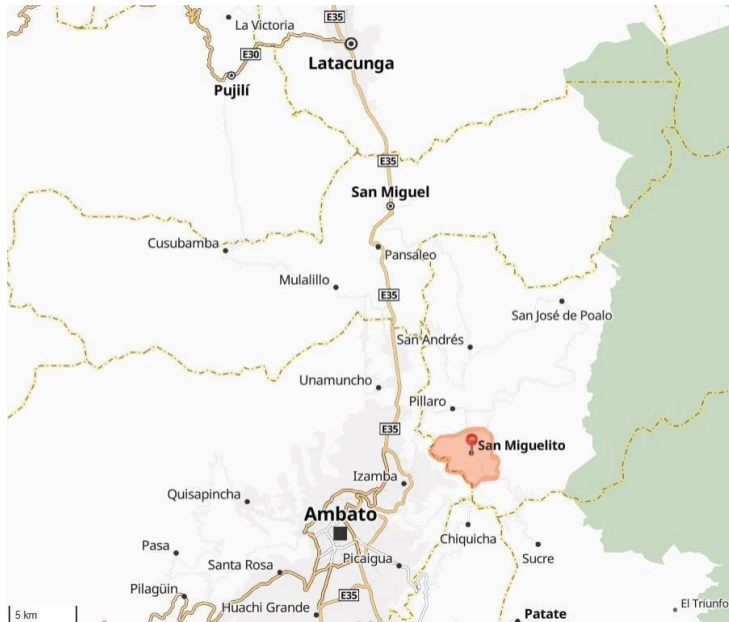
## **9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

La presente investigación con diseño experimental, permitió establecer las relaciones de las variables mediante manipulaciones controladas, buscando así garantizar la validez interna de los resultados obtenidos.

### **9.1 Área de estudio**

El espacio que se utilizó para llevar a cabo esta investigación fue el laboratorio de biotecnología de la clínica veterinaria de la Facultad de ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi - extensión Salache, en la ciudad de Latacunga, que se encuentra ubicada en la Panamericana Sur E35, 2,725 m.s.n.m,

La parroquia San Miguelito en el cantón Píllaro, provincia de Tungurahua, con una extensión territorial de 17,87 km<sup>2</sup>, entre los 2 700 y 2 748 m.s.n.m, siendo sus coordenadas de latitud 1° 12' 15" S (aprox. -1.2039°) y longitud 78° 32' 19" O (-78.5387°). Limitando al Norte: Quebrada de Quilimbulo y cantón Cotopaxi, al Sur: Parroquia Emilio María Terán, al Este: Cordillera Oriental, límite cantonal y al Oeste: Río Patate/Cutuchi (Ilustración 3) (58).



**Figura 3** Mapa de la parroquia San Miguelito de Pillaro

## 9.2 Materiales y equipos

### 9.2.1 Biológicos

- Conformado por 3 verracos pertenecientes a las razas yorkshire americano, pietrain alemán y duroc (un individuo por cada raza seleccionada).
- Huevos de gallina.

### 9.2.2 Químicos

- Diluyente Androstar.
- CryoGuard, diluyente de enfriamiento para semen de verraco (parte A).
- CryoGuard, diluyente de congelación para semen de verraco (parte B). □ CryoGuard Thaw, diluyente de descongelación para semen de verraco.
- Nitrógeno líquido (tanque 20 kg).
- Azul de metileno.

### 9.2.3 De oficina

- Cuaderno.
- Esferos.
- Lápiz.
- Borrador.
- Resma de papel bond.

### 9.2.4 De laboratorio

- Balanza.
- Estufa.

- Microscopio.
- Centrifugadora.
- Termómetro digital.
- Micropipeta electrónica.
- Tanque de nitrógeno.
- Cámara de Neubauer.
- Baño maría.
- Jeringas de 1 ml.
- Jeringas de 5 ml.
- Porta objetos.
- Cubre objetos.
- Alcohol 100 ml.
- Pipetas desechables 3ml.
- Rollo de papel secante.
- Bandas de pH.
- Tubos Falcon 50 ml.
- Tubos Eppendorf.
- Tubos Falcon 15 ml.
- Gasas.
- Pajuelas francesas.
- Esferas selladoras de pajuelas.
- Puntas estériles de micropipeta.
- Caja de guantes de nitrilo.
- Marcador indeleble.
- Vasos plásticos recolectores con malla.
- Vasos de precipitación 100 ml.
- Probeta 50ml.
- Tijeras.
- Agua bidestilada (1L).
- Jabón neutro (1L).

### **9.3 Grupo de estudio**

Para el estudio se seleccionarán 3 individuos de razas diferentes Yorkshire, Pietrain y Duroc (Tabla 2), para ser usados como referentes producto de sus cualidades reproductivas y

los parámetros del estado sanitario general, la madurez sexual alcanzada, y un historial reproductivo favorable, descartando los animales que presentaban signos clínicos de enfermedad, anomalías en la calidad seminal previa o comportamiento sexual. A su vez fueron evaluados todos los protocolos de vacunas correspondientes para cada individuo (Anexo 3, 4, 5).

**Tabla 2 Razas seleccionadas para el estudio**

<b>Individuo</b>	<b>RAZA</b>	<b>EDAD</b>
	YORKSHIRE	
1	AMERICANO	7 MESES Y MEDIO
2	PIETRAIN ALEMAN	8 MESES
3	DUROC	1 AÑO Y 6 MESES

#### **9.4 Variable de estudio**

##### **9.4.1 Variable independiente:**

- Diluyentes basados en protocolo de Minitube (Androstar Plus, CryoGuard par A y B)
  - Concentración de diluyentes

##### **9.4.2 Variables dependientes:**

- Evaluación de las muestras pre congelación y post congelación
- Motilidad de espermatozoides post congelación
- Recuperación de células espermáticas luego de la congelación
- Vigor espermático pre y post congelación
- Morfología espermática
- Tiempo criogenización entre muestras

##### **9.4.3 Variables de control**

- Factores ambientales del laboratorio (temperatura, humedad)
- Asepsia del procedimiento
- Técnica utilizada por el personal

#### **9.5 Preparación de Androstar plus**

El medio de conservación fue diluido en una proporción 1:1.5 de agua bidestilada a 36°C y Androstar. Posteriormente se mantuvo en baño maría para conservar la temperatura.

(Anexo 6) (59).

#### **9.6 Colecta seminal**

Se realizó el proceso de limpieza y preparación de cada maniquí, al igual que de cada individuo (verraco), usando Clorhexidina al 2%. (Anexo 7).

El proceso de recolección del semen fue mediante la técnica de mano enguantada, estimulando el pene con movimientos longitudinales sobre el prepucio, liberando así la fracción gelatinosa o prostática que funcionó como medio de nutrición para los espermatozoides. Una vez culminado el proceso, el vaso colector era tomada y medido el volumen eyaculado, siendo incorporado de manera inmediata la dilución Androstar plus, que presentaba la misma temperatura (60) (Anexo 8).

Para las muestras se consideraron 3 colectas con una diferencia de 7 días entre cada grupo de 3 eyaculados.

Los frascos de recolección fueron identificados y resguardados en un contenedor evitando de esa forma el ingreso de luz bajo una temperatura de 17 a 20 °C (Anexo 9).

## **9.7 Evaluación de semen diluido**

Dentro del proceso de laboratorio se establecieron las fases macroscópicas y microscópica.

### **9.7.1 Macroscópica**

Para el uso de los envases de transporte fueron determinados los siguientes parámetros:

- Si presentaban las marcas graduadas de las medidas.
- Que no presentaran olores fétidos.
- Con una adecuada apariencia lechosa, acuosa, cremosa o transparente.
- Se verificó el pH con el uso de las bandas de medición (Anexo 10) (59).

### **9.7.2 Microscópica**

#### **9.7.2.1 Motilidad individual**

Para su evaluación se utilizaron 10 µl de semen diluido sobre un portaobjetos y cubreobjetos precalentado a 37°C. Dicha muestra fue colocada en el microscopio y observado con el fin de 40x, para la visualización de 3 campos distintos, siendo considerado los movimientos rotatorios como indicativo de calidad óptima, mientras que la presencia de las células inmóviles fue clasificada como deficiente. La valoración de este parámetro fue porcentual para el que fue considerado como un rango óptimo el de 90% hasta 100%, aceptable un 70% y descartable cuando los valores eran inferiores al 70%. (Anexo 11) (59).

#### **9.7.2.2 Motilidad progresiva**

Se aplicó el mismo nivel de valoración porcentual para la determinación de la viabilidad espermática, considerando como óptimo el de 90% hasta 100%, aceptable un 70% y descartable con valores inferiores al 70%. Con el uso de una pipeta fueron extraídos 10 µl de semen diluido con Androstar Plus los cuales fueron colocados en un porta objeto, protegidos por el

cubreobjetos. Estas fueron evaluadas con el microscopio (40x), para poder observar tres campos distintos de esa muestra. Fue otorgada la mejor calificación para los espermatozoides con movimientos longitudinales de manera uniforme y los más bajos cuando presentaban movimientos erráticos o incluso inmóviles (59).

### 9.7.2.3 Concentración

De la misma forma fue preparada una dilución 1:200 con una muestra espermática que fue previamente diluida junto a una solución formolada al 10% hasta garantizar la obtención de una mezcla homogénea. Se tomaron 10 µl de la dilución siendo colocados entre la cámara de Neubauer (con 25 cuadrantes). Posterior a un breve período de estabilización, se procedió a realizar la contabilización de todos los espermatozoides dentro de los cuadrantes observados, siendo su concentración determinada con la fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contados}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10$$

Donde fueron utilizados 25 cuadrantes y un factor de dilución de 200 (Anexo 11).

### 9.7.2.4 Vigor

Para la evaluación de este parámetro se utilizó una escala del 1 al 5, con la asignación de los valores: 5 (muestras con células altamente activas y estimuladas) y 0 (carecen de movimientos) (59).

### 9.7.2.5 Morfología

Para la evaluación morfológica fueron tomados 5 µl de azul de metileno siendo agregados en el portaobjetos, a los que se le añadieron 5 µl de semen. Tras una espera de 20 segundos se realizó un frotis con la mezcla, que se secó en una estufa a 37 °C durante 30 segundos y se realizó la contabilización de al menos 100 espermatozoides, los valores de este parámetro fueron dadas de forma porcentual, siendo el rango de tolerancia mínima del 60%.

## 9.8 Preparación de diluyentes 9.8.1 Crioprotector de enfriamiento CryoGuard part A (cryoguard par A+ agua

### bidestilada+ yema de huevo + pellet)

Previo al proceso de dilución fueron realizados los cálculos de:

- **TSE** = Volumen del eyaculado × concentración (10<sup>9</sup> espermatozoides/mL)
- **TSS** = Volumen del sobrenadante × concentración (10<sup>9</sup> espermatozoides/mL)
- **TSC** = TSE – TSS Donde:
  - **TSE** representa el total de espermatozoides en el eyaculado.
  - **TSS** corresponde al número de espermatozoides en el sobrenadante, de acuerdo con parámetros previamente definidos.

- **TSC** indica el número total de espermatozoides corregido por muestra.

Posterior al cálculo del volumen total del pellet con el diluyente de enfriamiento que fue de 30 ml, esto representa el 50% del volumen total. Para empezar con la dilución se pesó en una gramera el cryoguard part A, para luego ser mezclado en 20 ml de agua bidestilada precalentada a 37° C, luego se dejó en reposo durante 20 minutos para la estabilización del pH. Posteriormente esta solución se le incorporó a 5 ml de yema de huevo, y se la revuelve cuidadosamente hasta crear una mezcla homogénea, finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente (Anexo 12) (59).

### **9.8.2 Crioprotector de congelación CryoGuard part B (cryoguard part B+ agua bidestilada+ yema de huevo+ dilución de cryoguard par A)**

En el segundo diluyente se añadieron 12,5 mL de Cryoguard Part B a 25 mL de agua bidestilada a temperatura ambiente, seguido de la incorporación de esta dilución a 5 mL de yema de huevo para formar una mezcla homogénea, siendo colocada en refrigeración a 5°C, para luego añadir la dilución de Cryoguard Part. El procedimiento fue realizado con todo el eyaculado y centrifugado durante 20 minutos a 3.000 rpm, formando así el pellet espermático al cual se le retiró y midió el sobrenadante.

Una vez mezcladas las soluciones fueron colocadas bajo refrigeración hasta una temperatura 5°C. Siendo combinadas para una solución final compuesta por: Parte A y Parte B. Para su estabilización durante a 5 °C (Anexo 13) (59).

### **9.9 Preparación y evaluación de pajuelas**

Se envasaron y sellaron pajuelas de 0.5 cc con una concentración de  $4 \times 10^9$  dejando una pequeña cámara de aire para estabilizar la presión de la pajuela cuando sea introducida al tanque, (Anexo 14). Posteriormente se llevó a las pajuelas a un refrigerador a 5 °C durante 1 hora y 30 minutos.

Luego de este tiempo las pajuelas fueron colocadas en las canastillas del tanque y sumergidas en nitrógeno líquido a -196 °C (Anexo 15).

Se dejó en criogenización bajo criterio de los evaluadores durante 7 días, posterior a este tiempo se realizó la evaluación espermática post descongelación las pajuelas fueron extraídas del tanque de nitrógeno y son colocadas a baño maría a 37°C durante 20 segundos para lograr su descongelación. (59).

Simultáneamente los tubos de Eppendorf también son precalentados en la platina y las variables a evaluar son: (Anexo 16).

### **9.9.1 Motilidad individual**

En la evaluación individual de la viabilidad post-descongelación, vertiendo todo el contenido de cada pajuela en los tubos Eppendorf junto y con la ayuda de una micropipeta, se tomaron 10 µl de esta dilución y se depositaron sobre un portaobjetos y cubreobjetos precalentado en una platina a 37°C, para ser observada en el microscopio.

### **9.9.2 Motilidad progresiva**

Fue aplicado la misma secuencia metodológica de motilidad individual, realizando el conteo de al menos 100 espermatozoides y observándose una uniformidad de resultados postdescongelación.

### **9.10 Costos de producción**

Fueron realizados cálculos basados en el total de insumos utilizados durante todo el proceso y cada una de sus fases recolección, procesamiento, dilución, criopreservación, en donde fueron considerados todos los materiales e insumos, buscando así obtener el costo promedio por unidad.

## **10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

El proyecto se desarrolló en un período de 47 días, 6 de mayo al 23 de junio del 2025), lo que permitió la ejecución de las diferentes fases planteadas.

### **10.1. Evaluar la viabilidad espermática con Androstar**

La evaluación seminal pre-congelación permitió la observación de diferentes concentraciones espermáticas que oscilaron entre 143,33 millones/mL para la muestra 3, 200 millones/mL para la muestra 1 y 180 millones/ mL para el individuo 2. Siendo para el individuo de la raza (Yorkshire) los mayores valores, seguida por Pietrain y luego Duroc. Monike Quirino y colaboradores dice en su investigación que obtuvieron eyaculados de 45 a 90 mL con concentraciones de 1.500 millones de células espermáticas que son relativamente bajas en comparación a las obtenidas en la presente investigación (61). Según la investigación de Córdova Izquierdo y colaboradores indica que la concentración espermática puede verse afectada por el uso de técnicas foto eléctricas computarizadas (62).

**Tabla 3 Evaluación seminal pre-congelación.**

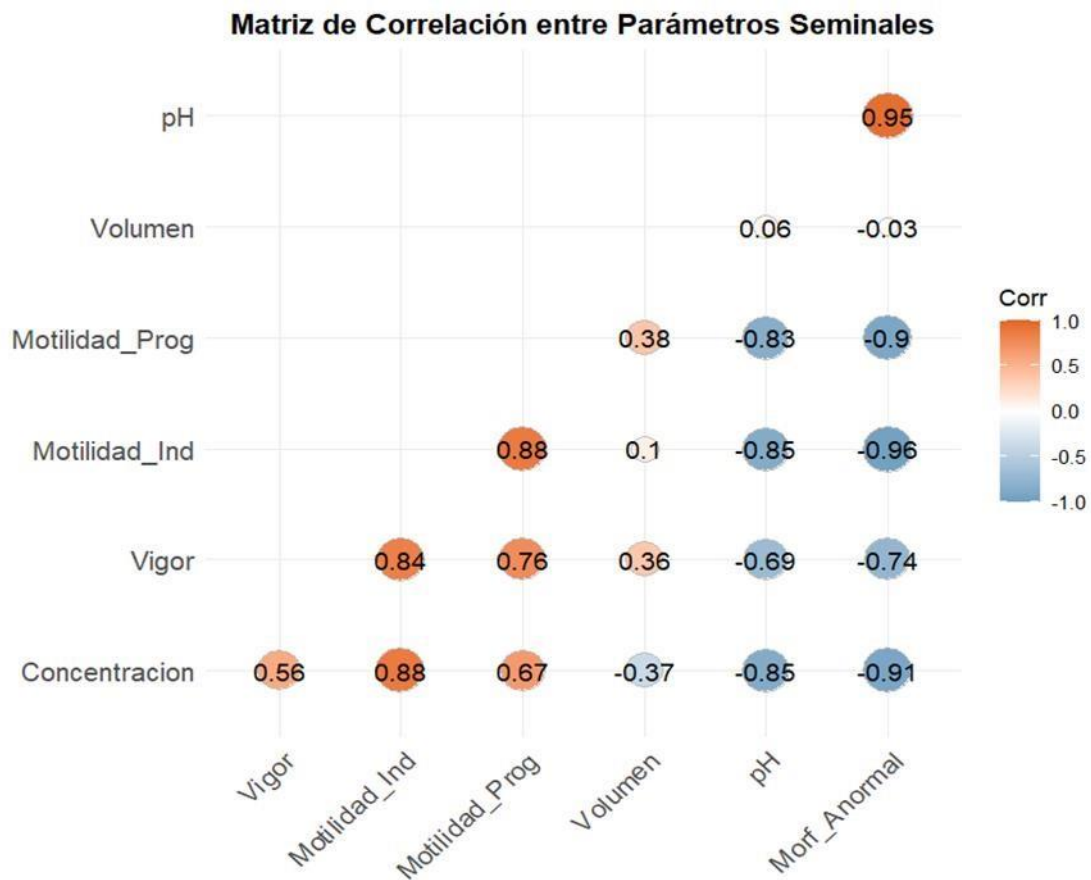
PARÁMETRO	TOMA 1			TOMA 2			TOMA 3		
	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>VOLUMEN</b>	150 ML	250 ML	200 ML	140 ML	230 ML	190 ML	140 ML	230 ML	190 ML
<b>MOTILIDAD INDIVIDUAL</b>	90%	95%	80%	90%	90%	75%	90%	90%	75%
<b>MOTILIDAD PROGRESIVA</b>	80%	90%	75%	85%	90%	75%	85%	90%	75%
<b>CONCENTRACIÓN</b>	200 M / mL	180 M / MI	150 M / mL	200 M / MI	180 M / mL	140 M / MI	200 M / MI	180 M / mL	140 M / MI
<b>VIGOR</b>	4/5	5/5	3,5/5	4/5	4/5	3,5/5	4/5	4/5	3,5/5
<b>PH</b>	7	7	8	7	7	7,6	7	7	7,6
<b>MORFOLOGÍA ANORMAL</b>	3%	2%	15%	3%	2%	15%	3%	2%	15%



En la Tabla 3, tras la evaluación seminal pre-congelación bajo tres tomas se revelan importantes diferencias entre todas las muestras analizadas, las cuales responden a cada objetivo planteado. Para la motilidad individual se observan valores altos para las muestras 1 el 90%, para la muestra 2 del 91 % respectivamente, siendo para la muestra 3 cuyos valores presentan una consistencia menor del 76%, lo que sugiere una relación con su avanzada edad o incluso las características genéticas de la raza. De acuerdo a Erazo dice que la muestra perteneciente al individuo PIC-166 obtuvo resultados similares al de la presente investigación con un 81.2% de motilidad individual pre-congelación (47).

En el estudio realizado por Sánchez (47), el autor concluye sobre la importancia de la variable racial dentro del elemento y eficiencia reproductiva, resaltando incluso que la raza Pietrain tiene tendencia para un mejor desarrollo anatómico reproductivo e incluso la calidad seminal, siendo la menor calidad la presentada por la raza Duroc, lo que puede deberse a su desarrollo glandular y testicular. Para Reyes (63), este conjunto de resultados puede presentar una vinculación con elementos propios de la raza, en donde incluso se han encontrado reducciones en las concentraciones de plasma cuando el animal es sometido a diferentes dietas proteicas, lo que a su vez se suma con diversas variaciones a nivel genético, siendo el caso para el ejemplar 3 el más resaltante en su viabilidad y motilidad espermática.

De igual forma, fueron observadas anomalías frecuentes sobre las unidades como las cabezas de alfiler, colas fraccionadas e incluso cabezas sueltas. Estas anomalías se reconocieron en las muestras del individuo 3, con un 15 %, frente al 2% del individuo 1 y el 3 % para el ejemplar número2. Esto sugiere que la raza Duroc presenta menor estabilidad estructural del eyaculado. Según Erazo revela que el individuo Y-273 el cual es un f1 De dos razas finalizadoras, muestra el mayor porcentaje de anomalías morfológicas en cabeza y cuello, refutando que presuntamente las determinaciones genéticas de las líneas finalizadoras sean mayormente susceptibles a estas alteraciones (64).



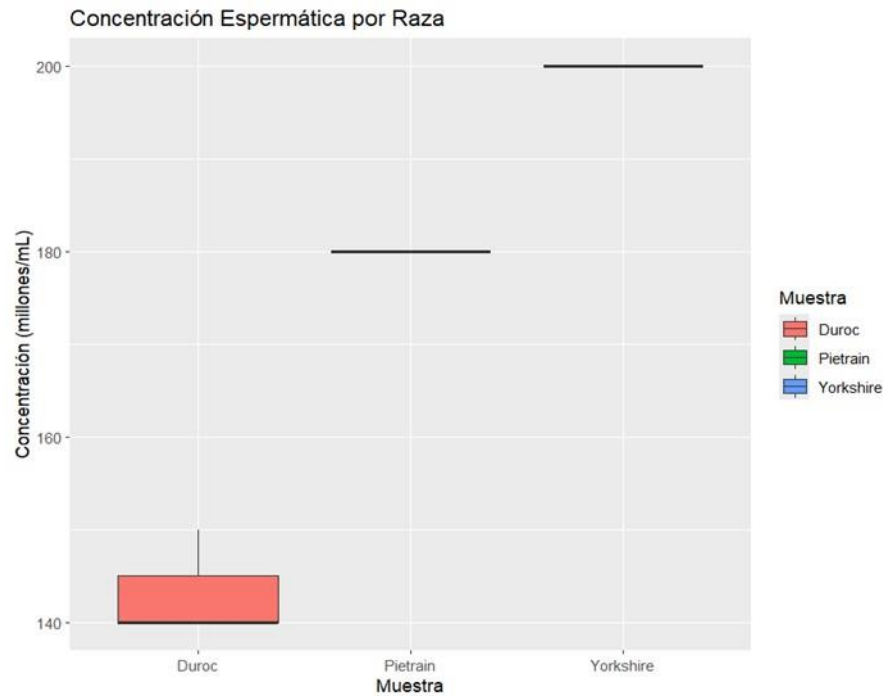
*Gráfico 1 Matriz de correlación entre los parámetros seminales.*

Aunado a estos resultados del (**Gráfico 1**), existen relaciones significativas entre diversas variables en donde se observa relación entre la motilidad individual ( $r = 0,89$ ) y progresiva indicando de esa forma que el movimiento y mejora tiene un desplazamiento direccional, y presentando una correlación negativa entre la morfología anormal y motilidad ( $r = -0,9$ ).

En el análisis correlacional (**Gráfico1**), a través de coeficiente de Pearson se revelaron valores de correlaciones positivas, entre la motilidad individual y la progresiva con ( $r = 0.88$ ), lo que radica en que una gran proporción de espermatozoides con movilidad tienden a estar asociados a mayores proporciones de células que presentan un movimiento rectilíneo e incluso eficiente. Asimismo, se alcanzó a evidenciar las correlaciones negativas entre la morfología anormal y la motilidad ( $r = -0.72$ ), lo cual es resaltante sobre el hecho de las anomalías morfológicas y la capacidad de movimiento del grupo de espermatozoides. Sin embargo, en el estudio de Karla Muñoz evidencia una correlación positiva de ( $P=0.332$ ) bajo el coeficiente de Pearson en variables como aglutinación y concentración con el uso de CASA que se diferencia con la presente investigación que utilizó la cámara de Neubauer (65).

**Tabla 4 Promedio de concentración espermática**

<b>SEMANA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>MUETRA 1</b>	200 mill/MI	200 mill/MI	200 mill/MI	200 mill/MI
<b>MUETRA 2</b>	180 mill/MI	180 mill/MI	180 mill/MI	180 mill/MI
<b>MUETRA 3</b>	150 mill/MI	140 mill/MI	140 mill/MI	143,33 mill/MI



**Gráfico 2 Matriz de variabilidad de concentración espermática**

Los datos de concentración espermática indican uniformidad en la muestra 1 con 200 millones de espermatozoides/ mL, la muestra 2 reflejó valores constantes en las tres tomas de 180 millones de espermatozoides/ mL mientras que los valores más bajos e inconsistentes en relación a este parámetro fueron de la muestra 3 con 143,33 millones de espermatozoides/ mL. Valverde en su investigación refleja que a diferencia de la presente investigación el individuo de raza Duroc reflejó los mejores valores de concentración espermática que los animales de raza Pietrain (66).

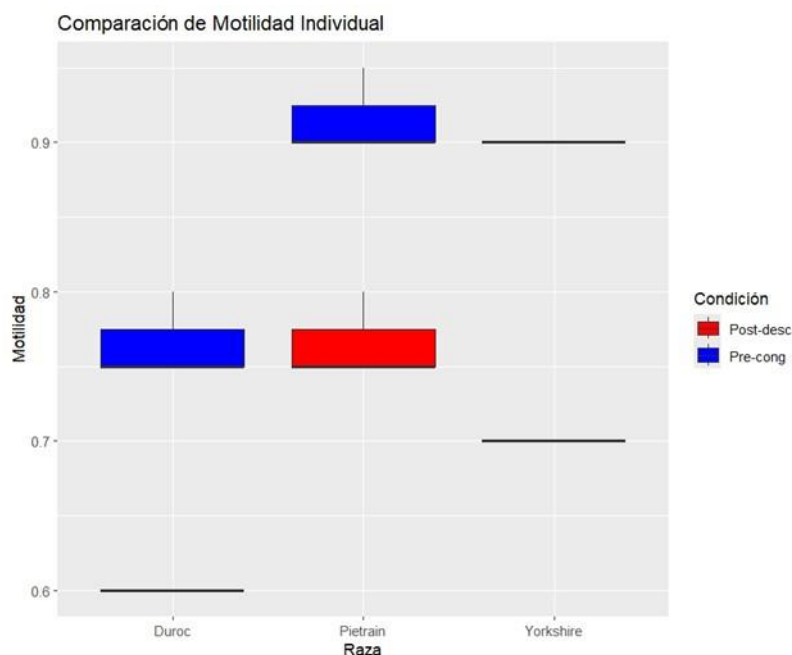
Según Valverde evidencia una notable correlación positiva entre la concentración espermática y el método usado para su evaluación, dando mejores resultados con CASA con un 95% de confiabilidad. (Gráfico2) (66).

### 10.1 Comparar los resultados pre-congelación y post-descongelación de dosis seminales porcinas

La crioconservación tuvo un impacto diferencial sobre los parámetros espermáticos evaluados. Para la motilidad se observó una diferencia significativa del ( $p < 0.001$ ), con una diferencia importante de 17.22 puntos porcentuales entre los valores de pre y post congelación, siendo para la motilidad progresiva la disminución menor del ( $p = 0.0222$ ) (**Gráfico 3**). La consistencia entre las diferentes tomas se observó estabilidad dentro de todos los resultados obtenidos para cada muestra, siendo para Duroc en donde se observaron las mayores variabilidades, lo que se debe posiblemente a una menor estabilidad a nivel fisiológico dentro de la calidad seminal (**Gráfico 2**). A. Kumaresan dice en su investigación que el semen de los verracos durante la criopreservación sufre cambios similares a la captación, provocando cambios en parámetros esenciales (Gráfico2) (67).

*Tabla 5 Evaluación seminal descongelado*

PARÁMETRO	TOMA 1			TOMA 2			TOMA 3		
	MUES	MUES	MUES	MUES	MUES	MUES	MUES	MUES	MUES
	TRA 1	TRA 2	TRA 3	TRA 1	TRA 2	TRA 3	TRA 1	TRA 2	TRA 3
MOTILIDAD INDIVIDUAL	0,7	0,8	0,6	0,7	0,75	0,6	0,7	0,75	0,6
MOTILIDAD PROGRESIVA	80%	85%	65%	85%	85%	60%	85%	85%	55%
VIGOR	4/5	4/5	3/5	4/5	4/5	3/5	4/5	4/5	3/5



**Gráfico 3** Comparación de motilidad individual

En la Tabla 5, Gráfico 3, todo el análisis de la evaluación seminal a nivel de la postcongelación alcanza a evidenciar la disminución dentro de los parámetros de calidad espermática cuando es comparada con la etapa pre-congelación, siendo esta reducción más acentuada para la muestra 3. La motilidad individual reduciéndose a promedio de 20 puntos porcentuales, aunque se mantiene alta para la muestra 2 con un 76.64%, para el individuo 2 un 70%, siendo el caso para la muestra 3 que su motilidad es sostenida de hasta el 60%, lo que sugiere una menor resistencia para el proceso de criopreservación. Bajo ese contexto Vargas (68), considera que la raza Duroc mantiene menor resistencia fisiológica frente al proceso de criopreservación, lo que se ve reflejado en una mayor caída de la motilidad individual, considerando que estos elementos pueden estar relacionados con diferentes factores nutricionales o micro elementos que son esenciales como el zinc y el selenio.

Para la motilidad progresiva, que es un elemento fundamental para la fertilidad, se observa un proceso de descenso, sobre todo en la muestra 3 con un, donde disminuye hasta un 55% para la tercera toma, siendo para la muestra 1 con un 83.33% y para el individuo 2 un 85%. Con el vigor espermático se puede conservar de una manera aceptable las muestras 1 de 4 y el sujeto 2 de igual manera, siendo para la muestra 3 en donde se observa el vigor más bajo de 3 para todas las tomas. Con estos resultados se observan en las muestras correspondientes a 1 (Yorkshire Americano) y 2 (Pietrain Alemán) alcanzar a presentar una mejor recuperación funcional tras la criopreservación, sugiriendo que sus condiciones pueden ser más adecuadas para la estandarización de todos los protocolos de congelación. Siendo el caso contrario para la muestra 3 que refleja menor tolerancia para todo el proceso realizado y que también puede estar

influenciada por una mayor edad del ejemplar o incluso su genética. Para Valverde *et al.* (66), evidenciaron que toda composición genética es fundamental para que se desarrollen variantes en las cinéticas del espermatozoide, donde incluso la especie Duroc tienden a mostrar menores proporciones de motilidad total y la progresiva sobre todo ante las razas Landrace o cruces con Pietrain.

## 10.2 Calcular el costo de producción por dosis seminal criopreservadas.

El análisis económico contempló un costo total de \$809.54, (Tabla 6), correspondientes a los elementos de oficina, insumos de laboratorio, reactivos y crioprotectores. Fueron usados un total de 180 pajuelas con un costo unitario de \$4.50 USD por pajuela, siendo por dosis 8 pajuelas de \$36.00 (Tabla 7). Para Ávila (69), cerca de un 78% de productores están implementado nuevas tecnologías como los elementos de inseminación artificial, con indicadores económicos de Valor Actual Neto (VAN) de \$119.526,79, una Tasa Interna de Retorno (TIR) del 50 % y una relación Beneficio/Costo (B/C) de 1.59, lo que sustenta que los sistemas que son trabajados de manera adecuada sustentan de manera viable a corto y largo plazo el desarrollo del sistema dentro del mercado, sobre todo para aquellos productores que buscan mejorar su eficiencia y capacidad.

**Tabla 6 Total de costos de producción**

COMPONENTE DEL COSTO	COSTO TOTAL
INSUMOS DE LABORATORIO	\$78.80
REACTIVOS Y CRIOPROTECTORES	\$723.19
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 801.99</b>

**Tabla 7 Costo estimado unitario por pajuela y dosis**

Concepto	Valor \$
COSTO TOTAL DEL PROCESO	801.99
NÚMERO TOTAL DE PAJUELAS	180
<b>COSTO POR PAJUELA</b>	<b>4.45</b>
PAJUELA POR UNIDAD (DOSIS)	8
<b>COSTO POR UNIDAD/DOSIS</b>	<b>35.60</b>

### 10.3 Resultados principales

1. Diferencias entre razas:
  - Pietrain mostró los mejores valores en motilidad (0.9-0.95) y vigor (4-5/5)
  - Duroc presentó los valores más bajos en motilidad y mayor porcentaje de anomalías morfológicas (15%) (Figura 1).
2. Efecto de la crioconservación:
  - Reducción significativa en motilidad individual ( $p < 0.001$ )
  - Pérdida menor en motilidad progresiva ○ El vigor se mantuvo relativamente estable
3. Consistencia entre tomas:
  - Los valores fueron muy consistentes entre las tres tomas para cada muestra
  - Mayor variabilidad observada en la muestra de Duroc
4. Relaciones entre variables:
  - Correlación positiva entre motilidad individual y progresiva ( $r = 0.89$ )
  - Correlación negativa entre morfología anormal y motilidad ( $r = -0.72$ ).

## 11. IMPACTOS TÉCNICOS SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS

### 11.1. Impacto técnico

La estandarización de biotecnologías como la congelación de semen porcino representa un progreso notable en el sector de tecnificación de la reproducción animal. La práctica de estas permite mejorar los procesos de recolecta, evaluación, dilución, congelación y conservación del material genético, respaldando un mayor porcentaje de viabilidad y fertilidad después de la congelación mediante la incorporación de métodos uniformes y establecidos, se optimiza la eficacia del uso de dosis seminales, se minoriza la versatilidad en los resultados y se simplifica el intercambio de tecnologías entre instituciones de inseminación artificial, laboratorios, granjas de producción. Además, permite establecer bancos genéticos que procuren la conservación de razas y líneas genéticas endémicas que ayudan a mantener la biodiversidad y de alto valor productivo que solvante las demandas per cápita de la nación.

### 11.2. Impacto económico

Desde el punto de vista económico, el proceso de criopreservación seminal porcina ayuda a reducir los costos de operación a largo plazo, disminuyendo las demás y necesidad que generan las grandes comunidades de verracos reproductores. A su vez aumenta la efectividad reproductiva debido a la inseminación profunda que se practica, esto permite la planificación de partos de forma más óptima y mejor la producción porcícola.

Brinda la posibilidad de conservar y diseminar semen de alta calidad genética lo cual genera nuevas fuentes y modelos de negocio, como son la comercialización de dosis congeladas, lo cual generaría plazas de empleos directos e indirectos. Sin embargo, es relevante que se considere el costo inicial en insumos, equipamiento y capacitación técnica del personal que estos tipos de biotecnologías representan al inicio, lo que podría ser una barrera para pequeños porcicultores y laboratorios si no se pone en práctica medios de respaldo financiero gubernamental o privado.

### **11.3. Impacto social**

En el área social, la estandarización de protocolos de criopreservación contribuye a la profesionalización del sector pecuario del país, promoviendo la preparación constante de veterinarios, técnicos pecuarios y trabajadores. La crio preservación generaliza la obtención de material genético de alto valor, haciendo que incluso fincas y comunidades pequeñas sean beneficiarios de genética mejorada sin la necesidad de importar o comprar animales o pajuelas de costos exorbitantes. Por otra parte, reduce la movilización de animales lo cual promueve el bienestar animal que es un aspecto ampliamente considerado hoy en día por parte de la sociedad, también promulga la inseminación artificial programada.

### **11.4. Impacto ambiental**

Este proyecto favorece a una reducción en el proceso de transporte de los animales vivos, disminuyendo de esa forma todo el conjunto de emisiones asociadas, generando a su vez técnicas de aprovechamiento de mayor eficiencia sobre los recursos genéticos, lo que sugiere una mayor proyección dentro del mercado ganadero garantizando de esa forma su sostenibilidad. Asimismo, toda la conservación del material genético preserva la gran diversidad biológica porcina, minimizando posibles impactos negativos, implementando su manejo de manera eficaz y responsable bajo el contexto de bioseguridad y eficiencia energética.

## **12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO**

*Tabla 8 Instrumentos electrónicos*

CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO \$	COSTO TOTAL \$
2	COMPUTADORA	400	800
2	CELULARES	400	800
1	IMPRESORA	200	200
1	REFRIGERADOR PEQUEÑO	220	220
	Total		2020

**Tabla 9 Elementos de oficina**

CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO \$	COSTO TOTAL \$
1	CUADERNO	1.00	1.00
1	LÁPIZ	0.25	0.25
1	BORRADOR	0.10	0.10
2	ESFERA	0.60	1.20
1	RESMA DE PAPEL BOM	5.00	5.5.00
	Total		7.55

**Tabla 10 Gastos fijos**

CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO \$	COSTO TOTAL \$
4	INTERNET	1.50	6.00
4	GASOLINA	10.00	40.00
4	LUZ	1.00	4.00
4	ALIMENTACIÓN	2.25	9.00
	Total		59.00

**Tabla 11 Insumos de laboratorio**

CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO	COSTO TOTAL
33	CAJA DE JERINGA DE 1 ML	\$0.15	\$4.95
6	CAJA DE JERINGA DE 5 ML	\$0.25	\$1.50
1	CAJA PORTA OBJETO	\$4.80	\$4.80
1	CAJA DE CUBRE OBJETO	\$3.50	\$3.50
1	FRASCO DE ALCOHOL 100 ML	\$3.00	\$3.00
3	PIPETAS DESECHABLES 3 ML	\$0.25	\$0.75
1	PAPEL SECANTE	\$3.25	\$3.25
20	BANDAS DE pH	\$0.25	\$5.00

10	TUBOS FALCON 15 ML	\$0.75	\$7.50
CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO	COSTO TOTAL
4	TUBOS FALCON 50 ML	\$1.05	\$4.20
9	TUBOS EPENDORF	\$ 0.05	\$0.45
50	GASAS	\$0.10	\$5.00
126	PAJUESLAS FRANCESAS	\$0.10	\$12.60
126	PERLAS SELLADORAS DE PAJUELAS	\$0.03	\$3.78
9	PUNTAS ESTÉRILES DE MICROPIPETA	\$0.03	\$0.27
1	CAJA DE GUANTES DE NITRILO	\$6.00	\$6.00
1	MARCADOR PERMANENTE	\$1.25	\$1.25
9	VASOS PLÁSTICOS RECOLECTORES CON MALLA	\$0.25	\$2.25
2	VASOS DE PRECIPITACIÓN DE 100	\$3.00	\$6.00
1	PROBETA PLÁSTICA 50 ML	\$1.75	\$1.75
1	TIJERAS	\$1.00	\$1.00
		<b>Total</b>	\$78.80

**Tabla 12 Reactivos y Crioprotectores**

CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO	COSTO TOTAL
----------	----------	-------	-------------

1	DILUYENTE ANDROSTAR	\$13.20	\$26.40
2	AGUA BIDESTILADAA (1L)	\$2.30	\$4.60
1	JBÓN NEUTRO (1L)	\$4.00	\$4.00
CANTIDAD	ELEMENTO	COSTO	COSTO TOTAL
2	CRYORGUARD, DILUYENTE DE ENFRIAMIENTO PARA SEMEN DE VERRACO (PARTE A)	\$128,99	\$257,98
2	CRYORGUARD, DILUYENTE DE CONGELACIÓN PARA SEMÉN DE VERRACO (PARTE B)	153,60	\$307,20
2	CRYORGUARD THAW, DILUYENTE DE DESCONGELACIÓN PARA SEMEN DE VERRACO.	32,03	\$64,06
5	HUEVOS	\$0.25	\$1.25
1	NITRÓGENO LÍQUIDO (TANQUE 20 kg)	\$57.70	\$57.70
		<b>Total</b>	\$723.19

## 13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 13.1. Conclusiones

Se logró determinar que el uso de medios de conservación como Androstar plus en el proceso de criogenización de semen porcino brinda mayor protección ante factores ambientales, fisiológicos y biológicos que puedan llegar a poner en peligro la calidad y viabilidad de las muestras a congelar, esto debido a que estabiliza variables como el pH y la contaminación bacteriana, debido a su composición.

El procedimiento de la criopreservación de semen porcino tiene un impacto significativo en la viabilidad seminal ente las fases de pre-congelación y post-descongelación, afectando directamente a la motilidad individual, los parámetros de motilidad progresiva y vigor reflejan mayor estabilidad en ambas etapas. Los resultados demuestran una posible variabilidad de las razas en respuesta a la crioconservación. Bajo este concepto, el individuo 2 mostró mayor

capacidad de recuperación al impacto de la congelación de semen, mientras que el sujeto 3 exhibió una menor uniformidad y mayor variabilidad en ambos momentos.

El costo de producción fue considerado de manera fundamental buscando así optimizar toda la producción y viabilidad del proyecto.

### **13.2. Recomendaciones**

Es importante optimizar los protocolos de criopreservación que sean adaptados a cada una de las razas, dado que esta característica es de gran influencia para las variables de calidad seminal, así como a las respuestas para todo el proceso.

Es necesario implementar los controles periódicos de calidad seminal, buscando de esa forma garantizar la estabilidad y confiabilidad de las dosis seminales, que son recomendables para las evaluaciones constantes en las diferentes tomas, sobre todo en las razas de mayor variabilidad como lo es el caso del individuo 3.

Se debe profundizar en los estudios de factores fisiológicos y hormonales para las futuras investigaciones abordando variables endocrinas y comportamentales, con niveles de testosterona que pueden incluso afectar la calidad seminal y variabilidad observada.

Desde el punto de vista estadístico se sugiere incrementar el número de individuos evaluados con el fin de obtener resultados más precisos en relación a la expresión de la racial.

## **14. BIBLIOGRAFÍA**

1. Porkdata Afiliados. El sector agrícola del Ecuador en cifras. [En línea]; 2022 [Citado 2025 Marzo 11]. Disponible en: <https://aspe.org.ec/estadisticas/>.
2. Razas porcinas. La criopreservación espermática del semen porcino. [En línea]; 2023 [Citado 2025 Abril 28]. Disponible en: [https://razasporcinas.com/la-criopreservacionespermatca-del-semen-porcino/?utm\\_source#google\\_vignette](https://razasporcinas.com/la-criopreservacionespermatca-del-semen-porcino/?utm_source#google_vignette).
3. Porkdata afiliados. Avance de la porcicultura en Ecuador. [En línea]; 2022 [Citado 2025 Marzo 12]. Disponible en: <https://aspe.org.ec/>.
4. Ayala D, Peralvo J, Madril K, Burgos A. Suplementos alimenticios en porcicultura como alternativa a los antibióticos. AlfaPublicaciones. 2022; 4(3): p. 39-65.
5. CICA V. Retos y experiencias para lograr la soberanía alimentaria y sustentabilidad. [En línea]; 2020 [Citado 2025 Marzo 18]. Disponible en:

[http://escuelamezcalapa.unach.mx/images/ArchivosCongreso/CICAV\\_MEMORIA\\_2020-1.pdf](http://escuelamezcalapa.unach.mx/images/ArchivosCongreso/CICAV_MEMORIA_2020-1.pdf).

6. Gonzáles Y. Sistema de crianza y producción de los porcinos. [Tesis de licenciatura]. Lima: Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán y Valle; 2021.
7. Balogh E, Boglarka A, Roska L, Debnar V, Varga O, Rakty J, et al. Evaluation of porcine semen quality by portable and desktop CASA systems - short communication. *Acta veterinaria Hungárica*. 2020; 20(2): p. 197-199.
8. Flores M, Rosales C, Vélez L, Chávez A. Influencia del nivel nutricional sobre la calidad seminal y el comportamiento sexual de los machos cabríos tratados con días largos artificiales. *Biotecnia*. 2021; 23(1): p. 36-44.
9. Pezo F. Preservation of boar semen: An update. [En línea]; 2018 [Citado 2025 Febrero 12]. Disponible en:  
[https://www.academia.edu/102480557/Preservation\\_of\\_boar\\_semen\\_An\\_update?utm\\_source](https://www.academia.edu/102480557/Preservation_of_boar_semen_An_update?utm_source).
10. Peña J. Uso de agentes sexadores en porcinos. [Tesis de licenciatura]. Ocaña: Universidad Francisco de Paula Santander; 2024.
11. García J, Garzón R, Chicaiza L, Villavicencio B. Métodos de recolección del semen de *Vicugna pacos* y revisión de los parámetros seminales utilizando diluyente Triladyl®. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. 2024; 11(2): p. 54-64.
12. Ciudad C. Inseminación artificial de ganado porcino. [En línea]; 2020 [Citado 2025 Marzo 2025]. Disponible en:  
[https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1984\\_05.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1984_05.pdf).
13. Bolaños O. Evaluación del efecto de la metformina en la viabilidad espermática de semen ovino refrigerado. [Tesis de ingeniería]. Pamplona: Universidad de Pamplona; 2020.
14. Carreño M, Zambrano J, Carreño N. El uso del *áloe vera* y la glucosa como elementos protectores para la conservación del semen porcino. *Polo del conocimiento*. 2022; 7(11): p. 1-12.
15. CIAP. Manejo del semen. [En línea]; 20 [Citado 2019 Enero 11]. Disponible en:  
<https://www.ciap.org.ar/Sitio/Archivos/recoleccion-del-semen-de-cerdo.pdf>.

16. Montoya J. Efecto de la adición de L-carnitina y ácido ascórbico sobre la calidad espermática de los eyaculados de verracos y eficiencia en la IA de cerdas. [Tesis de licenciatura]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2024.
17. López P. Efecto de la fracción del eyaculado y la temperatura de conservación sobre la calidad espermática del semen porcino. [Tesis de ingeniería]. Elche: Universitat Miguel Hernández; 2023.
18. Rodríguez S. Evaluación de la calidad espermática de semen porcino criopreservado en diferentes niveles de coenzima Q10. [Tesis de ingeniería]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2024.
19. Carrasco A, Toapanta O, Miranda E, Silva P. Evaluación de tres diluyentes incorporados en el semen de porcinos. Polo del conocimiento. 2023; 8(11): p. 1-17.
20. Valverde A, Barquero V, Carvajal V. Biotecnología aplicada al estudio de la movilidad del semen porcino. Agronomía Mesoamericana. 2021; 32(2): p. 662-680.
21. Tsakmakidis I, Khalifa T, Boscos C. Age-related changes in quality and fertility of porcine semen. Biol Res. 2012; 12(45): p. 381-386.
22. Córdova I, Fermín M, Lajud C, Perea G, Rojas M, Saltijeral O, et al. Efecto del PH en la conservación del semen verraco diluido. [En línea]; 2003 [Citado 2025 Marzo 28]. Disponible en: [https://www.amvec.com/memories/memorias/2003/2003\\_084.pdf](https://www.amvec.com/memories/memorias/2003/2003_084.pdf).
23. Ipuz H. Publicación: Comparación de métodos de evaluación de las características espermáticas del semen porcino comercial. [Tesis de ingeniería]. Ibagué: Universidad Cooperativa de Colombia; 2023.
24. Jiménez K. Uso de aditivos como alternativas para mejorar la eficiencia en la inseminación artificial de porcinos: Revisión de Literatura. [Tesis de ingeniería]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; 2021.
25. Del Valle A. Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos. Revista electrónica de Veterinaria. 2017; 18(10): p. 1-18.
26. Veloz D. Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. [Tesis de maestría]. Cuenca: Universidad de Cuenca; 2017.

27. Althouse G, Kuster C, Clark S, Weisiger R. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 2000; 53(5): p. 1167-1176.
28. Ibujés V. Efecto antioxidante de la vitamina C, sobre la calidad espermática de semen porcino diluido. [Tesis de ingeniería]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2024.
29. Barquero V, Víquez L, Calderón J, Valverde A. Frecuencia de fotogramas óptima para evaluar la cinética espermática de verracos con un sistema CASA-Mot1. *Agronomía Mesoamericana*. 2021; 32(1): p. 1-18.
30. Villegas G. Evaluación de la calidad seminal de cerdos criollos (*Sus scrofa domesticus*) de la comunidad Colonche de la zona rural de la provincia de Santa Elena. [Tesis de ingeniería]. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena; 2022.
31. Bermúdez G. Evaluación de la viabilidad del semen porcino con la adición de conservantes para mejorar su calidad. [Tesis de medicina]. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana; 2023.
32. Kondracki S, Wysokińska A, Kania M, Górski K. Application of Two Staining Methods for Sperm Morphometric Evaluation in Domestic Pigs. *Journal of Veterinary*. 2017; 61(3): p. 3456-349.
33. Anatomy Learner. Sperm Under Microscope with Labeled Diagram. [En línea]; 2022 [Citado 2025 Marzo 19]. Disponible en: <https://anatomylearner.com/sperm-undermicroscope/>.
34. Cadena J. Evaluación de semen porcino centrifugado de raza Pietrain para la obtención de dosis con alta concentración espermática. [Tesis de medicina]. Cevallos: Universidad Técnica de Ambato; 2024.
35. Luna A. Calidad espermática de sementales porcinos según líneas genéticas. [Tesis de especialización]. Buenos Aires: Universidad Nacional de Plata; 2024.
36. Shutterstock. Sperm cell anatomy. [En línea]; 2020 [Citado 2025 Marzo 23]. Disponible en: [https://www.shutterstock.com/es/image-vector/illustration-humansperm-cell-diagram-2410703637?dd\\_referrer=https%3A%2F%2Fdocs.google.com%2F](https://www.shutterstock.com/es/image-vector/illustration-humansperm-cell-diagram-2410703637?dd_referrer=https%3A%2F%2Fdocs.google.com%2F).
37. Alcivar O. Evaluación andrológica en cerdos reproductores destinados a la producción de semen en la granja López Suarez Parroquia Guare. [Tesis de medicina]. Babahoyo:

- Universidad Técnica de Babahoyo; 2023.
38. Visgar. Imagen Esperma. [En línea]; 2020 [Citado 2025 Marzo 6]. Disponible en: [https://visgar.vetmed.ufl.edu/en\\_porrep/breeding-soundnessevaluation/images/po00492.jpg](https://visgar.vetmed.ufl.edu/en_porrep/breeding-soundnessevaluation/images/po00492.jpg).
  39. Angulo L. Evaluación de termorresistencia de semen comercial porcino mediante análisis espermático asistido por computadora- CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis Arequipa - 2021. [Tesis de medicina]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2022.
  40. Rodríguez E. Evaluación de dos diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino refrigerado en el trópico bajo colombiano. [Tesis de ingeniería]. Cúcuta: Universidad Francisco de Paula Santander; 2020.
  41. Gonzáles D. Efecto de la suplementación con ldl y antioxidantes en el diluyente para la refrigeración de semen porcino en la integridad y la funcionalidad espermática. [Tesis de ingeniería]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2023.
  42. Cuenca M, Avellaneda J. Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2017; 18(9): p. 1-12.
  43. Producción animal. Criopreservación del semen porcino. [En línea]; 2025 [Citado 2025 Mayo 17]. Disponible en: <https://www.produccionanimal.com/criopreservaciondel-semen-porcino/>.
  44. Contreras F. Evaluación de dos protocolos de criopreservación de semen equino. [Tesis de ingeniería]. República de Panamá: Universidad de Panamá; 2022.
  45. Instituto Bernabeu. Congelación de esperma y custodia. [En línea]; 2025 [Citado 2025 Marzo 7]. Disponible en: <https://www.institutobernabeu.com/es/congelacion-deesperma-y-custodia/>.
  46. Gómez C, Mozo R, Cabrejas S. Semen porcino congelado. Mapa. 2008; 1(1).
  47. Sánchez K. Morfometría comparativa del tracto reproductor pre-púber de cerdos criollos y cruzados. [Tesis de ingeniería]. Huacho: Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión; 2025.
  48. United States Department of Agriculture. Boar Semen Collection, Transportation, Processing and Cryopreservation Protocol Semen collection. [En línea]; 2020 [Citado 2025 Mayo 15]. Disponible en:

[https://agrin.ars.usda.gov/protocols\\_page\\_dev/display\\_html?doc\\_name=Boar+Semen+Collection%2C+Transportation%2C+Processing+and+Cryopreservation+Protocol&doc\\_path=%2Fprotocol\\_documents%2FBoar+Sperm+Cryopreservation+with+BF5+Diluent+2020.html&record\\_source=U](https://agrin.ars.usda.gov/protocols_page_dev/display_html?doc_name=Boar+Semen+Collection%2C+Transportation%2C+Processing+and+Cryopreservation+Protocol&doc_path=%2Fprotocol_documents%2FBoar+Sperm+Cryopreservation+with+BF5+Diluent+2020.html&record_source=U).

49. Minitube. Viabilidad del semen de verraco conservado en ANDROSTAR PLUS nueva formulación con antibióticos de tercera generación. [En línea]; 2011 [Citado 2025 Mayo 12]. Disponible en:  
[https://www.phibrosaludanimal.com/news/androstarplus/reporte-tecnico-nuevoandrostar-plus\\_es.pdf?utm\\_source](https://www.phibrosaludanimal.com/news/androstarplus/reporte-tecnico-nuevoandrostar-plus_es.pdf?utm_source).
50. Andrade A, Grossfeld R, Knox R. In vitro effects of two different commercial freezing and thawing extenders on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2022; 236(22): p. 1-11.
51. Minitube. Choice of extender to optimize boar sperm production. [En línea]; 2021 [Citado 2025 Junio 1]. Disponible en:  
[https://www.minitube.com/catalog/en/headernavigation/focus-topics/choice-of-extender-3883/?utm\\_source](https://www.minitube.com/catalog/en/headernavigation/focus-topics/choice-of-extender-3883/?utm_source).
52. Minitube. Minitube boar semen extenders. [En línea]; 2022 [Citado 2025 Junio 3]. Disponible en: [https://leporcshow.com/wp-content/uploads/sites/4/2022/10/LeafletBoar-Semen-Extenders\\_en\\_220902.pdf?utm\\_source](https://leporcshow.com/wp-content/uploads/sites/4/2022/10/LeafletBoar-Semen-Extenders_en_220902.pdf?utm_source).
53. Minitube. Aproveche el potencial de congelación de su semental. [En línea]; 2021 [Citado 2025 Febrero 3]. Disponible en:  
<https://www.minitube.com/catalog/es/headernavigation/temas-de-interes/aproveche-el-potencial-de-congelacin-de-su-semental3941/>.
54. Varela E, Rojas M, Restrepo G. Asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por citometría de flujo de semen bovino congelado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2020; 31(4): p. 17-33.
55. Minitube. Cryoguard Thaw, diluyente de descongelación para semen de verraco. [En línea]; 2021 [Citado 2025 Marzo 5]. Disponible en:  
<https://www.minitube.com/catalog/es/diluyente-cryoguard-p7527/>.

56. Chakraborty S, Saha S. Understanding sperm motility mechanisms and the implication of sperm surface molecules in promoting motility. *Middle East Fertility Society Journal*. 2022; 27(4): p. 18-33.
57. Caiza C. Optimización de diluyentes para el manejo y conservación del semen porcino. [Tesis de ingeniería]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2022.
58. Guevara M. El rescate histórico - cultural del barrio Huaynakuri y su contribución al desarrollo turístico en la parroquia de San Miguelito del canton Santiago de Pillaro de la provincia de Tungurahua. [Tesis de Grado]. Ambato: Universidad Técnica de Ambato; 2012.
59. Minitube International AG G. Freezing of Boar Semen. Informe, ficha técnica..
60. Minitube. Androstar® Plus without antibiotics, 47 g = 1 l. [En línea]; 2021 [Citado 2025 Marzo 12]. Disponible en: [https://www.minitube.com/catalog/en/androstar-plusp1533/?utm\\_source](https://www.minitube.com/catalog/en/androstar-plusp1533/?utm_source).
61. Quirino M, Nunes V, Costa M, Risa R, Schukze M, Goncalves A, et al. Sperm concentration of boar semen doses and sperm quality: Novel perspectives based on the extender type and sperm resilience. *Animal Reproduction Science*. 2023; 225: p. 1-18.
62. Villa A, Córdova A, Gutiérrez P. Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción Mexicana. *Revista Veterinaria*. 2015; 26(1): p. 69-74.
63. Reyes I. Probiótico fecinor (*Enterococcus faecium*) adicionado a dietas estándar y con baja proteína para cerdos en engorda. [Tesis de maestría]. Puebla: Colegio de Postgraduados; 2010.
64. Erazo E. Efecto de la criopreservación sobre las características microscópicas del espermatozoide porcino. [Tesis de ingeniería]. Honduras: Universidad Zamorano; 2007.
65. BM Editores. Correlación entre el grado de aglutinación y su lectura de concentración en semen de cerdo utilizando tres métodos analíticos. Correlación entre el grado de aglutinación y su lectura de concentración en semen de cerdo utilizando tres métodos analíticos. [En línea]; 2025 [Citado 2025 Mayo 20]. Disponible en: <https://bmeditores.mx/secciones-especiales/correlacion-entre-el-grado-de-aglutinacion-y-su-lectura-de-concentracion-en-semen-de-cerdo-utilizando-tres-metodos-analiticos/>.
66. Valverde A, Madrigal M, Camacho M, Zambrana A, López L. Effect of breed composition on sperm quality of boar. *Agronomía Mesoamericana*. 2018; 29(3): p.

485–506.

67. Kumaresan A, Siqueira A, Hossain M, Bergqvist A. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. *Cryobiology*. 2011; 63(3): p. 78-88.
68. Vargas S. Efecto de la suplementación de Zinc y Selenio sobre la aptitud reproductiva y calidad seminal en cerdos reproductores. [Tesis de Grado]. Babahoyo: Universidad Técnica de Babahoyo; 2025.
69. Ávila E. Estudio de factibilidad para la implementación de un laboratorio de producción de semen porcino comercial. [Tesis de Grado]. Santa Elena: Universidad Estatal Península de Santa Elena; 2019.

