



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN PORCINO CON LA ADICIÓN
DE CONSERVANTES PARA MEJORAR SU CALIDAD”

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTOR: GUIDO FERNANDO BERMÚDEZ ÁLVAREZ

TUTOR: DR. FROILÁN PATRICIO GARNICA MARQUINA, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Guido Fernando Bermúdez Álvarez con documento de identificación N° 0106529993, manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 26 de abril del 2023

Atentamente,



Guido Fernando Bermúdez Álvarez

0106529993

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Guido Fernando Bermúdez Álvarez con documento de identificación N° 0106529993, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Evaluación de la viabilidad del semen porcino con la adición de conservantes para mejorar su calidad”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario y Zootecnista, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 26 de abril del 2023

Atentamente,



Guido Fernando Bermúdez Álvarez

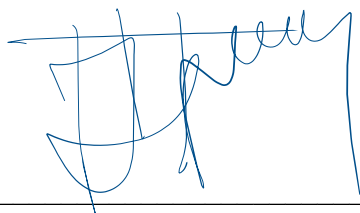
0106529993

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Froilán Patricio Garnica Marquina con documento de identificación N° 0101650299, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN PORCINO CON LA ADICIÓN DE CONSERVANTES PARA MEJORAR SU CALIDAD”, realizado por Guido Fernando Bermúdez Álvarez con documento de identificación N° 0106529993, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 26 de abril del 2023

Atentamente,



Dr. Froilán Patricio Garnica Marquina, Mgtr.

0101650299

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mis padres Fernando Bermúdez y Lucia Álvarez, a mi hermano Pedro Bermúdez que me han apoyado a lo largo de la carrera, ayudándome a conseguir mis metas y orientándome en la mejor dirección, dándome consejos, guía, teniéndome paciencia con mis errores peros sabiendo darme palabras de aliento para no flaquear y no perder de vista la meta de terminar mi carrera.

También dedico mi trabajo de titulación a mis mentores, tutores, amigos y futuros colegas que me dieron la confianza para ser mejor, de acogerme como becario, de poder responder con sus expectativas, de buscar siempre ser mejor sin perder la humildad y la ganas de siempre aprender de la mejor manera.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mi padre Fernando Bermúdez que me guio en el camino de la M.V.Z inculcándome el respeto por los animales y por siempre darme consejos en los peores momentos; también por saber tenerme paciencia con los errores que he cometido y darme guía para sobrellevarlo, además de las enseñanzas que me brindo para llegar a ser mejor persona y profesional. A mi madre Lucia Álvarez que siempre me ha tenido paciencia y me ha dado apoyo para realizar mis metas, ya que ella con el cariño que me ha demostrado no me ha dejado flaquear para poder conseguir mis metas, también quiero agradecer a mi hermano Pedro, que gracias a que es médico ha podido ayudarme en mi formación y ha sabido aconsejarme en momentos de dudas, y guiarme en mi modo de proceder para llegar a ser mejor persona y profesional.

Quiero agradecer a todos mis maestros que supieron compartir sus conocimientos y habilidades con paciencia para ayudarme en mi formación y llegar a ser profesional, con sus oportunos consejos y palabras de ánimos para no rendirme y seguir adelante a pesar de las dificultades de la carrera.

Un agradecimiento especial al Dr. Patricio Garnica MVZ, Tutor de este trabajo de Titulación, así como al Ing. Pedro Webster J, a la Dra. Mónica del Carmen Brito S. MVZ, al Dr. Cristhian Sagbay D. MVZ. y al Dr. Juan Masache M. MVZ, maestros que me apoyaron y compartieron sus conocimientos año tras año, hasta culminar mis estudios MVZ.

Al Dr. Andrés Galarza L. MVZ por apoyarme en el desarrollo de mi trabajo de Titulación y además de las enseñanzas que me brindó para poder avanzar en mi camino y llegar a cumplir mi meta de ser M.V.Z, siguiendo su ejemplo como profesional, de intentar ser mejor y la confianza que me dio para poder superarme en conocimientos y habilidades, dándome cabida como su becario e intentando cumplir con sus expectativas, siendo un gran mentor y amigo, dándome palabras de motivación para prepararme como profesional.

Quiero agradecer de igual forma a grandes amigos y futuros colegas como el Dr. Mauricio Dumas y al Dr. Xavier Samaniego que me han apoyado en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal y enseñado en mi formación M.V.Z para prepararme para la vida profesional.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	16
<i>ABSTRACT</i>	17
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	18
1.1 Problema.....	18
1.2 Delimitación.....	21
1.2.1 Temporal.....	21
1.2.2 Espacial.....	21
1.2.3 Académica.....	21
1.3 Explicación del problema.....	22
1.4 Objetivos.....	24
1.4.1 Objetivo general.....	24
1.4.2 Objetivos específico.....	24
1.5 Hipótesis.....	24
1.5.1 Hipótesis alternativa.....	24
1.5.2 Hipótesis nula.....	24
1.6 Fundamentación teórica.....	25
<i>2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL</i>	26
2.1 Porcicultura en el Ecuador.....	26
2.2 Inseminación artificial en el Ecuador.....	27
2.3 Semen.....	28
2.3.1 Recolección de semen.....	29
2.4 Sistema CASA SCA.....	30
2.4.1 Parámetros cinemáticos (<i>MICROPTIC SL</i> , 2022):.....	31
2.5 Diluyentes para el semen de verraco.....	32
2.5.1 Características y funciones de los diluyentes.....	34
2.5.2 Componentes de los diluyentes.....	35
2.5.3 Tipos de diluyentes por su duración.....	36
2.5.4 Diluyentes a corto plazo.....	37
2.5.5 Diluyentes a largo plazo.....	37
2.5.6 Causas de la degradación del semen en la conservación.....	38
2.5.7 Evaluación espermática por Fluorescencia.....	43
<i>3. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	45
3.1 Materiales.....	45

3.1.1 Físicos.....	45
3.1.2 Biológicos.....	46
3.1.3 Químicos	46
3.2 Metodología	46
3.3 Diseño estadístico.....	47
3.4 Población y muestra.	47
3.5 Obtención de las muestras.....	48
3.5.1 Preparación de los tratamientos con melatonina (ME).	50
3.6 Interpretación y lecturas de las variables en estudio	51
3.6.1 Evaluación de la cinemática espermática.....	52
3.6.2 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.	54
3.7 Operacionalización de variables.....	56
3.7.1 Variables independientes.....	56
3.8 Toma y registro de datos	59
3.9 Consideraciones éticas	59
4. <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	60
4.1 Evaluación de las motilidades	60
4.2 Evaluación de las velocidades.....	63
4.3 Evaluación de los parámetros de relación de progresión	71
4.4 Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.	77
4.5 Frecuencia de batida de flagelo.	79
4.6 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática	81
4.7 Objetivo específico dos: determinación del costo beneficio en la adición del conservante (melatonina) en diferentes concentraciones.	83
4.8 Discusión.....	89
5. <i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	92
5.1 Conclusiones	92
5.2 Recomendaciones.....	93

6. *REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*..... 94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Materiales Físicos</i>	45
Tabla 2. <i>Materiales Biológicos</i>	46
Tabla 3. <i>Materiales Químicos</i>	46
Tabla 4. <i>Tratamientos utilizados en el experimento</i>	48
Tabla 5. <i>Evaluación del volumen, Ph, color, y olor del semen fresco.</i>	49
Tabla 6. <i>Variables independientes: Melatonina (ME), Tiempo de almacenamiento, Semen de porcino.</i>	56
Tabla 7. <i>Variable dependiente: Parametros de Motilidad.</i>	57
Tabla 8. <i>Motilidad Total % (MT): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV=45.33%.</i>	60
Tabla 9. <i>Motilidad Total % (MT): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV=45.33%.</i>	61
Tabla 10. <i>Motilidad Progresiva % (MP): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 53.70%.</i>	63
Tabla 11. <i>Motilidad Progresiva % (MP):Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 53.70%.</i>	63
Tabla 12. <i>Porcentaje de Velocidad Curvilínea $\mu\text{m/s}$ (VCL): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 42.49 %.</i>	65
Tabla 13. <i>Porcentaje de Velocidad Curvilínea $\mu\text{m/s}$ (VCL): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 42.49 %.</i>	65
Tabla 14. <i>Porcentaje Velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 58.08 %.</i>	67
Tabla 15. <i>Porcentaje Velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 58.08 %.</i>	67
Tabla 16. <i>Porcentaje Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 43.54 %.</i>	68
Tabla 17. <i>Porcentaje Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 43.54 %.</i>	69
Tabla 18. <i>Índice de rectitud % (STR): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 30.06 %.</i>	72
Tabla 19. <i>Índice de rectitud % (STR): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 30.06 %.</i>	73

Tabla 20. <i>Porcentaje de Linealidad (LIN): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 29.47 %.</i>	74
Tabla 21. <i>Porcentaje de Linealidad (LIN): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 29.47 %.</i>	75
Tabla 22. <i>Porcentaje de Oscilación (WOB): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 22.22 %.</i>	76
Tabla 23. <i>Porcentaje de Oscilación (WOB): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 22.22 %.</i>	77
Tabla 24. <i>Porcentaje de Amplitud del movimiento lateral de la cabeza μm (ALH): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 36.00 %.</i>	78
Tabla 25. <i>Porcentaje de Amplitud del movimiento lateral de la cabeza μm (ALH): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 36.00 %.</i>	79
Tabla 26. <i>Porcentaje de Frecuencia de cruce Hz (BCF): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 25.61 %.</i>	80
Tabla 27. <i>Porcentaje de Frecuencia de cruce Hz (BCF): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 25.61 %.</i>	81
Tabla 28. <i>Integridad de la Membrana Plasmática Vitalidad (%): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 54.38 %.</i>	82
Tabla 29. <i>Integridad de la Membrana Plasmática Vitalidad (%): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 54.38 %.</i>	83
Tabla 30. <i>Costo de producción del Tratamiento control (T0) (dólares).</i>	84
Tabla 31. <i>Costo de producción con adición de MELATONINA (dólares).</i>	85

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Porcentaje de Motilidad Total % (MT) de muestras espermáticas porcinas (n=175) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μ M (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 45,33%	60
<i>Figura 2.</i> Porcentaje de Motilidad Progresiva % (MP) de muestras espermáticas porcinas (n=175) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μ M (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 53,70%	62
<i>Figura 3.</i> Porcentaje de Velocidad Curvilínea μ m/s (VCL) de muestras espermáticas porcinas (n=175) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μ M (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 42,49%	64
<i>Figura 4.</i> Velocidad promedio (VAP, μ m/s) de muestras espermáticas porcinas (n=175) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μ M (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 58,08.	66
<i>Figura 5.</i> Velocidad rectilínea (VSL, μ m/s) de muestras espermáticas porcinas (n=175) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μ M (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 43,54%	68
<i>Figura 6.</i> Velocidad y Progresividad (%): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 28,62%	70
<i>Figura 7.</i> Inicie de rectitud % (STR) en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 30,06%	72
<i>Figura 8.</i> Porcentaje de Linealidad (LIN) en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 29,47%	73
<i>Figura 9.</i> Porcentaje de Oscilación (WOB) en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 22,22%	76
<i>Figura 10.</i> Amplitud del movimiento lateral de la cabeza μ m (ALH): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 36%	78
<i>Figura 11.</i> Frecuencia de cruce Hz (BCF): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 25,61%	80
<i>Figura 12.</i> Integridad de la Membrana Plasmática Vitalidad (%): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 54,38%	82
<i>Figura 13.</i> Incremento en porcentaje del costo por tratamiento, frente al control (T0)	86
<i>Figura 14.</i> Incremento de tiempo (horas) de vida, post dilución con el antioxidante Melatonina, en dosis crecientes: (T1 (1 μ M), T2 (10 μ M), T3 (50 μ M) y T4 (100 μ M).	87
<i>Figura 15.</i> Relación Costo Beneficio, a más horas de Vida, menos porcentaje de costo de producción, y menor concentración de Melatonina.	88

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Granja Experimental Iruis	22
Fotografía 2. Recolección de eyaculado de verraco, transporte y dilución.....	49
Fotografía 3. Evaluación de la cinética de semen de verraco en el Equipo CASA.....	51
Fotografía 4. Análisis parámetros cinéticos en el sistema CASA Sca.	53
Fotografía 5. Viabilidad espermática con fluorescencia con yoduro de propidio.....	55

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la Melatonina (ME) suplementado a un diluyente comercial sobre la motilidad y viabilidad del semen porcino refrigerado. Se obtuvo cinco eyaculados de un cerdo Landrace, con recolección semanal por 5 semanas. Cada eyaculado en cinco alícuotas y se diluyó con NutrixCel® Ultra suplementado con 0 (control, T0), 1 μM (T1), 10 μM (T2), 50 μM (T3), y 100 μM (T4) de ME, almacenado a 5°C durante 7 días. Los parámetros cinemáticos y de viabilidad se evaluaron cada 24 h mediante un sistema (SCA-Evolution® 2018). Se aplicó un DBCA donde se evidenció los resultados, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos en ningún parámetro cinemático ni vitalidad en cada tiempo evaluado. En general, todas las variables disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) sus valores según incrementó el tiempo de almacenamiento. Las muestras de T1 redujeron la motilidad total (MT) a las 72 h de almacenamiento, mientras que las muestras T0 y T2 disminuyeron a las 48 h, y a las 24 h (T3 y T4), respectivamente. Dosis bajas de ME (Ej. T1 y T2) redujeron parámetros cinemáticos como VCL, VAP, SRT, ALH, BCF, más tarde (Ej. 48 a 96 h) al comparar con dosis altas de ME (T3 y T4). De hecho, el tratamiento T4 disminuyó ($P < 0,05$) a las 24 h. En conclusión, la suplementación de dosis bajas de ME (1 μM) a un diluyente comercial preservó mejor la motilidad en comparación con las dosis altas (50 y 100 μM).

ABSTRACT

In this sense, this research evaluated the antioxidant effect of the different concentrations of Melatonin (ME) supplemented with a commercial extender on the kinematic parameters and viability of chilled boar semen stored for long-term. For this purpose, five semen ejaculates were obtained from a Landrace pig male, collected weekly for four weeks. Each ejaculate was divided into five aliquots and diluted with NutrixCell® Ultra supplemented with 0 (control, T0), 1 μ M (T1), 10 μ M (T2), 50 μ M (T3), and 100 μ M (T4) of Melatonin (ME) and stored at 5°C for 144 hours (7 days). Kinematic parameters and viability were assessed every 24 h using a CASA system (SCA-Evolution® 2018) and the propidium iodide fluorescent test, respectively. We apply a DBCA were the results did not show significant differences ($P > 0.05$) between treatments in any kinematic parameter or vitality at each time evaluated. Overall, all the kinematic variables and viability decreased significantly ($P < 0.05$) their values as the storage time increased. The T1 samples reduced total motility (TM) at 72 h of storage, while other samples decreased at 48 h (T0 and T2) and 24 h (T3 and T4). Low doses of ME (i.e., T1 and T2) reduced some kinematic parameters (curvilinear [VCL] and average-path [VAP] velocities, straightness [STR], amplitude of lateral head displacement [ALH], and beat-cross frequency [BCF]) afterwards (48 - 96 h) compared to high doses of ME (i.e., T3 and T4). In fact, the vitality of samples diluted with T4 decreased ($P < 0.05$) at 24 h of cold-storage. In conclusion, despite not improving the kinematics or viABILITY of chilled boar spermatozoa, the supplementation of low doses of ME (1 μ M) to a commercial extender preserved motility better compared to high doses (50 and 100 μ M).

1. INTRODUCCIÓN

El almacenamiento de semen refrigerado, es el método de referencia para la conservación de semen de verraco a una temperatura de 5°C hasta por 6 días, ya que después de este tiempo se han detectado alteraciones en la integridad acrosomal, capacitación espermática y motilidad. Para este almacenamiento, es importante siempre el uso de diluyentes que aporten cierta protección contra el descenso de temperatura en la membrana espermática y contra la acción de contaminación por bacterianas (Moscardini, et al., 2014; Córdova et al., 2015; Ávalos et al., 2018).

Dentro de las biotecnologías reproductivas, el almacenamiento o conservación seminal debe ser resaltado, ya que permiten reducir el metabolismo espermático, afectando lo mínimo posible su fertilidad (Moscardini *et al.*, 2014). Para ello, existen tres métodos de preservación seminal (fresco, refrigerado y congelado).

La conservación de semen en fresco es utilizada con gran éxito en ovinos, porcinos y camellos y para ella, son utilizados principalmente los diluyentes de corta duración; la muestra seminal se almacena a una temperatura de 15-17°C (temperatura ambiente), con el objetivo de poderse emplear inmediatamente después de su recolección o, en tal caso, transportar la muestra a cortas distancias para su uso (Pérez, 2008; Trejo et al., 2013; Cueto et al., 2016; Cuenca y Avellaneda, 2017).

1.1 Problema

La producción de cerdos de traspatio en Ecuador es de más de 30.000 TM/año. En la encuesta de superficie y producción de 2017 citó que la población porcina del Ecuador era de 1.115.473 cerdos (ASPE, 2018). El consumo estimado de carne de cerdo en 2010

era de 7,3 kg/persona/año. En el año 2016 la cifra había aumentado a 10 kg/persona/año. En los cantones de Paute y Gualaceo de la provincia del Azuay; regiones donde el consumo de carne de cerdo va en incremento, resulta urgente difundir e implantar la inseminación artificial (IA) porcina, utilizando nuevas razas de cerdos con mayores aptitudes para afrontar mejor la producción de carne al desposte con mejores características de calidad.

Ochoa, (2002) señala que en el Ecuador más del 80 % de la producción nacional de cerdas se encuentran en el rango de explotaciones que poseen de 1 a 4 cerdas de cría. Aproximadamente el 50 % de estas unidades no disponen de reproductor; a menudo el verraco de una finca, generalmente criollo, es alquilado o el productor entrega de 1 a 2 crías por la monta (CIAT, 1998, citado por Ochoa, 2002). Con este antecedente, la biotecnología como la IA es una opción válida para mejorar el número de lechones, y la productividad de las crías por cerdas.

Román y Román (2018) indican que, sin duda alguna, la IA es actualmente la biotecnología de elección utilizada en todo el mundo para producir cerdos. La IA es imprescindible para los programas de cruzamiento y mejora genética porcina. En la última década, se han desarrollado nuevas biotecnologías aplicables al proceso de producción de dosis seminales (colecta de semen, valoración seminal, conservación y envío de dosis) en los Centros de Transferencia Genética (CTG) (De Alba Romero C, 2015). En efecto, esto ha permitido que la IA sea un proceso mucho más eficiente en términos de tiempo, mano de obra y resultados productivos.

La aplicación de la IA se justifica por ser la herramienta fundamental en la mejora genética. Sin embargo, para lograr efectos ponderados de beneficio, es preciso disponer de

lotes de cerdas que entren en celo de manera simultánea, a fin de aprovechar el material genético que se dispone para un proceso de reproducción consecuente (Rivera, 2012).

Alemán et al., (2007) señalan que actualmente un 99 % de las IA realizadas en cerdas utilizan semen conservado de forma ideal a temperatura entre 15 y 20°C durante 1 a 5 días. Cuando se conserva al semen en temperaturas por debajo de 14°C se presentan alteraciones de la membrana del espermatozoide repercutiendo en el poder fecundante del mismo (Hafez y Hafez, 2002). Por otra parte, temperaturas por encima de los 20°C disminuyen notablemente el tiempo de vida útil de los espermatozoides. En el cerdo, la preservación del semen es limitada debido a que los espermatozoides de esta especie son especialmente sensibles al choque de frío por debajo de 15°C, las cuales generan daños en la membrana plasmática y acrosomal, resultando una disminución en la viabilidad y funcionalidad espermática. (Flores et al., 2018).

La conservación del semen porcino en condiciones de refrigeración permite aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco. Para ello, los diluyentes de semen porcino deben contener una fuente de ácido (ácido cítrico), azúcar (glucosa), un tampón (bicarbonato, TRIS, HEPES) y antibióticos para el mantenimiento metabólico, protección contra al choque de frío, variación del pH del medio, mantenimiento de la presión osmótica (NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (Rugeles et al., 2013). Durante mucho tiempo se han hecho estudios que buscan disminuir el número de espermatozoides por dosis con la aplicación de la IA convencional, obteniendo los mismos parámetros reproductivos de fertilidad, que con monta natural (Toalombo, 2007).

La literatura reporta, que el 99 % de las inseminaciones realizadas en el mundo, emplean un método de conservación durante 1-5 días a 15 - 20°C, conservando su capacidad

fecundante. Variaciones de temperatura pueden afectar la calidad del semen debido a su sensibilidad a cambios térmicos, por lo que se hace necesario conservarlo a 17°C y evitar fluctuaciones (Codoy, 2017).

En tal sentido con esta investigación se quiere aportar conocimiento a la evaluación de la viabilidad del semen porcino con la adición de conservantes (Ej. melatonina) para conservar su calidad espermática y disminuir la degeneración celular. En este sentido, el semen conservado a mediano plazo (5 a 10 días) permitirá ofrecer a los pequeños productores, dosis seminales porcinas para su aplicación en diferentes granjas.

1.2 Delimitación

1.2.1 Temporal

El presente trabajo tuvo una duración de 400 horas, las cuales fueron distribuidas en trabajo de campo, y redacción del documento de tesis.

1.2.2 Espacial.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción en la Granja Irquis de la Universidad de Cuenca (Ver Figura 1), que está ubicada en el km 23 de la vía a Girón –Pasaje, en las coordenadas 79° 03' 42'' -3° 03' 36'', a una altitud de Altitud 2663 msnm (Google Earth, 2022).

1.2.3 Académica

El presente trabajo está relacionado con el área de la REPRODUCCIÓN ANIMAL, mediante la Evaluación de la viabilidad del semen porcino, con la adición de conservantes, para mejorar su calidad.

Fotografía 1. *Granja Experimental Irquis*

Fuente: *Universidad de Cuenca (Google Earth 2022)*

1.3 Explicación del problema

Los diluyentes utilizados en IA porcina permiten prolongar la vitalidad espermática, manteniendo una motilidad progresiva óptima y su capacidad fecundante. La capacidad fecundante del semen porcino mantenido en diferentes diluyentes de corta y larga duración no evidencian diferencias significativas de fertilidad y prolificidad durante las 72 a 96 horas de almacenamiento. Otros diluyentes presentan cierto grado de ventaja dado que permiten conservar el semen del verraco hasta 7 o más días, preservando un gran porcentaje de fertilidad. No obstante, para lograr estos propósitos, los diluyentes deben contener ciertos

tipos de antioxidantes y aditivos que permitan proteger a los espermatozoides contra todos los efectos deletéreos, con lo que, la finalidad de este proyecto, fue evaluar, que con la adición de nuevos antioxidantes se puede alcanzar más días de conservación del semen en refrigeración, con un buen porcentaje de fertilidad, apoyando a porcicultores en el mejoramiento de tecnologías de la reproducción.

En el cerdo la preservación del semen es limitada debido a que los espermatozoides de esta especie son especialmente sensibles a temperaturas por debajo de 15°C, las cuales generan daños en la membrana plasmática y en el acrosoma, alterando la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática (Sánchez, 2007).

Tales efectos de la conservación seminal se han relacionado con la producción excesiva de radicales libres (RL) en el espermatozoide (Córdova et al., 2009) que a altas concentraciones generan estrés oxidativo (EO), causando alteraciones celulares como la lipoperoxidación de la membrana plasmática, situación a la que el espermatozoide es particularmente susceptible, debido a las altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados en la membrana plasmática (Tamayo, 2013).

Si bien los espermatozoides son sensibles al estrés oxidativo, también están equipados con un sistema antioxidante en el plasma seminal e intracelular, los cuales están armónicamente integrados para contrarrestar los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Córdova et al., 2009).

Se ha demostrado la actividad antioxidante de la melatonina, con efectos superiores a otros antioxidantes (E, C y N-acetilcisteína) a nivel de células hepáticas y una de sus principales cualidades es que varios de los metabolitos, como el N1-acetil-N2-formil 5-methoxykynuramine y N1-acetil-5-methoxykynuramine, que resultan de la interacción de la

melatonina con el radical hidroxilo, funcionan también como eliminadores de RL, es decir, que una molécula de melatonina puede neutralizar hasta 3 radicales libres (Ressmeyer A et al. 2003).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad del semen porcino con la adición de un conservante en diferentes concentraciones para mejorar su calidad.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la viabilidad con la adición de NUTRIXcell Ultra más MELATONINA al 1; 10; 50 y 100 μM .
- Determinar el costo beneficio en la adición del conservante en diferentes concentraciones.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alternativa

La adición del conservante permite mejorar la viabilidad del semen porcino almacenado en frío a largo plazo.

1.5.2 Hipótesis nula

La adición del conservante no mejora la viabilidad del semen porcino almacenado en frío a largo plazo.

1.6 Fundamentación teórica

El presente trabajo tuvo como objetivo sistematizar datos obtenidos en el laboratorio: sobre el índice de supervivencia espermática adicionando antioxidantes como diluyente para la conservación del semen de cerdo refrigerado, mediante la utilización del Sistema CASA Sperm Class Analyzer (CASA SCA), esperando obtener un gran porcentaje de fertilidad, que supere a los diluyentes comerciales.

Es conocido que la preservación de semen de cerdo es limitada, debido a que los espermatozoides de esta especie son especialmente sensibles a temperaturas por debajo de 15°C, las cuales generan daños en la membrana plasmática y en el acrosoma, alterando la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática (Sánchez, 2007). Por otra parte también, se conoce las bondades de algunos diluyentes comerciales para la conservación del semen porcino; así también la Melatonina (ME), que es una hormona, que se produce naturalmente en pequeñas cantidades en todos los animales (en la glándula pineal), ha sido estudiada como agente antioxidante para alargar la vida del semen en bovinos, caballos y otros animales, es por eso que en esta investigación se quiere estudiar el comportamiento del semen de cerdo refrigerado frente a la adición de diluyente comercial mas melatonina en diferentes dosis, con el propósito de identificar la dosis más adecuada, que permita prolongar la vida de los espermatozoides del semen de cerdo.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1 Porcicultura en el Ecuador

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estima que la población mundial de cerdos es de 907 millones de cabezas, que comprenden 534 millones en Asia, 204 millones en Europa, 73 millones en América Latina y el Caribe, 72 en EE.UU. y Canadá, 19 millones en África y 5 millones en Oceanía (Benítez, 2000).

La población porcina del Ecuador en año 2017 fue de 1.115.473 cerdos (ASPE, 2017). Falconi y Paredes (2011), citaron que el 65% del total de los cerdos se encuentran en la Sierra y el 30% en la Costa; el 79% es considerado como cerdo criollo, 19% mestizo y apenas el 2% son razas puras. Según la FAO en el año 2000, en el Ecuador, las piaras locales están compuestas en el 50% de los casos por 1-4 madres y que contribuyen con el 25% de la producción nacional de carne y con el 30% de grasa. Los resultados del censo en el año 2017 mostraron que, actualmente, en el país existen 1.737 granjas porcinas con 20 o más animales o con un mínimo de 5 madres, presentando una media de producción/madres de 16,83 cerdos por año. En las fincas tecnificadas este promedio es de 22,4 cerdos/madre/año, mientras que en las fincas no tecnificadas es de 9,6 cerdos/madre/año. La relación entre madres y cerdos es de un cerdo por cada 15 madres. Benítez (2000), señaló que en el país existían 2,1 millones de porcinos explotados en el sistema tradicional y que de esta población tan sólo del 3% al 5%, según la región, eran animales provenientes de las razas ibéricas. En la zona central y en el sur del país se encuentran genotipos provenientes de los cerdos ibéricos conocidos como: runas, yungas o criollos.

2.2 Inseminación artificial en el Ecuador.

El desarrollo de la inseminación artificial (IA), en cerdas ha tenido grandes avances a lo largo de la historia, iniciando en Rusia al inicio del siglo XX, para luego difundirse a otros países (Torres Midence et al., 2013). Esta no es una tecnología nueva, pero tiene mucha importancia para el manejo reproductivo en países desarrollados y cada vez está cobrando más importancia en los países de América Latina (Castillo, 2006). Gadea (2003), señala que en la década de los ochenta se desarrollaron ampliamente protocolos de inseminación artificial, y que gracias a los trabajos realizados por Chris Polge fue reintroducida esta técnica a la reproducción de porcinos. La inseminación artificial (IA) forma hoy en día una parte integral de la rutina de trabajo en todo tipo de explotaciones porcinas, desde granjas núcleo hasta granjas comerciales. Durante los últimos 10 años su uso se ha incrementado enormemente. En la actualidad se estima que más del 30% de los 76 millones de cerdas en el mundo son inseminadas. Los países de la Comunidad Europea encabezan la lista del uso de IA con un 58.7% de cerdas inseminadas, siendo Francia, Finlandia y España los principales. En la región del Pacífico y Asia el 39% de las cerdas son inseminadas, mientras que en América Latina el porcentaje de utilización de IA es de 30% (Benítez, 2000).

La dilución y conservación del semen porcino en refrigeración es una práctica que brinda a la industria porcina la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco, para ello los diluyentes en donde se conserva el material seminal, deben proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y los antibióticos para la inhibición del desarrollo microbiano (Rugeles et al., 2013). El uso del semen

congelado en la actualidad está limitado a casos muy específicos o bien asociado a la introducción de un nuevo material genético de alto valor para inseminar animales puros en granjas de selección o simplemente se asocia a labores de investigación (Gadea, 2005).

2.3 Semen

Los espermatozoides porcinos se caracterizan por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y una baja concentración de colesterol. Esto los hace más sensibles al estrés, como el choque térmico. (Bailey et al., 2008; Martín Hidalgo et al., 2011; López Rodríguez et al., 2012; Schulze et al., 2013). La membrana plasmática del espermatozoide permite los intercambios entre la célula y su entorno a través de varios tipos de transporte. Si se produce un choque térmico, su estructura es alterada, y la membrana se vuelve cada vez más permeable, lo que crea una pérdida de componentes celulares. La movilidad y vitalidad de los espermatozoides son entonces afectados. (Drobnis et al., 1993; Johnson et al., 2000.)

En la valoración seminal del cerdo es importante tener en cuenta los siguientes aspectos como: el volumen, que puede ir desde 200ml–300ml, pudiendo variar dependiendo las características individuales del verraco, tales como raza, edad, capacidad reproductiva y condiciones ambientales (Sancho & Vilagran, 2014). El Color, es normal cuando poseen un aspecto blanco cremoso, considerándose los colores rojizos o amarillentos como anormales que a su vez indican contaminación de la muestra durante la eyaculación (Ordoñez, 2017). La Concentración se identifica mediante el método de hemocitómetro, utilizando la cámara de Neubauer (para conteo de glóbulos rojos), el conteo de los espermatozoides se realiza de los cinco cuadrantes al azar y se saca un promedio, este se multiplica por 10⁷ para obtener una concentración por cm³ (Galarza, 2013). Otro aspecto a tener en cuenta es el plasma seminal, que tiene un pH que varía entre 7,3 y 7,9 y está compuesto por agua en un 94%-

98% (Bonet, García & Sepúlveda, 2013), iones, azúcares, ácidos orgánicos, hormonas, aminoácidos y proteínas (Vilela, 2014). La composición del plasma seminal varía entre especies y entre individuos (Maxwell et al., 2007) inclusive entre eyaculados de un mismo individuo debido probablemente a patologías, época del año, estado fisiológico del animal o alimentación (Hernández, 2013). Las proteínas son las que destacan por su cantidad e importancia, estas se pueden clasificar en tres grupos: Proteínas ricas en cisteína (CRISP), Proteínas que contienen fibronectina tipo II (Fn-2), y espermadhesinas (Rodríguez-Martínez et al., 2011). Otro compuesto del plasma seminal son los prostasomas, que son relacionados con procesos de estabilización de membranas, que previenen la capacitación y la reacción acrosómica espontánea (Hernández, 2011). También se destacan enzimas como γ -glutamyl-transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP) los cuales tienen influencia en la calidad seminal y en la función de la membrana además de participar en diferentes procesos metabólicos durante la maduración espermática. También existen iones como el Zinc (Zn) y el Selenio (Se) que están implicados en la funcionalidad espermática por poseer propiedades antioxidantes (López et al., 2013).

2.3.1 Recolección de semen

La técnica más utilizada para recolectar el semen, es la denominada de “mano enguantada o doble guante”, para lo cual el verraco es debidamente entrenado, se realiza en una sala con un potro fijo, con condiciones sanitarias y de seguridad adecuadas tanto para el animal como para el operador (Kubus, 2010). El material que este en contacto con el líquido seminal debe estar limpio y esterilizado y a una temperatura de 37°C y mínima de 32°C, una vez obtenido el semen se debe llevar al laboratorio para su respectivo análisis (Campos, 2015). La primera secreción preeyaculatoria de las glándulas uretrales 10-15 ml no

debe ser recolectada (Palma, 2008), debido a que este líquido no contiene espermatozoides, pero puede contener residuos uretrales/orina, y una alta cantidad de bacterias (Bonet et al., 2013). A continuación, le sigue una fracción rica en espermatozoides, células espermáticas y poca secreción con un volumen de 30-50 ml., y luego, una fracción pobre en espermatozoides secreción de vesículas seminales y pocas células espermáticas (Palma, 2008). La secreción de las glándulas bulbouretrales de aspecto similar a los granos se descarga en forma intermitente en la segunda mitad de la eyaculación y debe ser retenida con filtro de gasa previamente colocado en la bolsa recolectora porque no es deseable para la preparación y conservación del semen. Althouse et al. (2001) señala que la eyaculación puede durar de 5 a 7 minutos y el volumen del eyaculado suele ser superior a 300 ml. Según Palma (2008), la eyaculación puede durar aproximada 10 minutos, el aislamiento térmico del recipiente colector es muy importante para que el semen llegue a laboratorio con una temperatura mínima de 32°C. El semen recién eyaculado es extremadamente sensible al enfriamiento rápido y debe ser refrigerado recién después de la pre dilución a la misma temperatura del semen y diluyente.

2.4 Sistema CASA SCA.

El Sistema CASA SCA® para análisis de semen permite una evaluación precisa, repetitiva y automática de una muestra espermática de los siguientes parámetros: movilidad, concentración, morfología, fragmentación de ADN, vitalidad, reacción del acrosoma y leucocitos. SCA® movilidad y concentración detecta los espermatozoides de forma automática. Las muestras se analizan en contraste de fases (contraste de fases positivo en humano y negativo en animal). Se recomienda el análisis en fluorescencia en el caso de muestras con diluyentes que tengan yema de huevo o leche.

El conteo de espermatozoides y el análisis de la motilidad se realizan simultáneamente. Los espermatozoides móviles se analizan siguiendo la trayectoria del esperma y la velocidad. Los resultados, que comprenden todos los parámetros cinemáticos del CASA, se presentan en cuestión de segundos. SCA® es una poderosa herramienta, ya que el sistema CASA es el único método objetivo que permite analizar el total de espermatozoides progresivos y móviles en una muestra, dando una idea del potencial fértil de los mismos (MICROPTIC, 2022).

2.4.1 Parámetros cinemáticos (MICROPTIC SL, 2022):

Movimiento total (MT, %): porcentaje de espermatozoides que presentan una Velocidad curvilínea $VCL > 10 \mu\text{m/s}$. Este parámetro nos indica, tanto el porcentaje de espermatozoides móviles como una serie de detalles referentes a las características de la movilidad individual y colectiva (velocidad, desviación de la linealidad) (Abaigar et al., 1999), e incluso tiene una cierta relación con la fertilidad de las muestras/verracos (Holt et al., 1997; Tardiff et al., 1999).

Movimiento progresivo (MP, %): porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento con un índice de rectitud ($STR \geq 75\%$) dentro de la muestra.

Estáticos (%): El porcentaje de espermatozoides que presentan una Velocidad curvilínea ($VCL < 10 \mu\text{m/s}$).

Velocidad curvilínea ($VCL, \mu\text{m/s}$): se obtiene a partir de la unión de los puntos donde se localiza el centroide de la cabeza del espermatozoide en cada frame durante el tiempo de adquisición de la imagen. Nos aporta información sobre la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.

Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): se obtiene a partir de la unión entre el primer y el último punto durante el tiempo de adquisición de la imagen. Indica la distancia recorrida por el espermatozoide entre estos dos puntos de su trayectoria en función del tiempo.

Velocidad de la trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$): se obtiene por extrapolación de los puntos que determinan la VCL. Nos muestra la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.

Índice de Linealidad (LIN, %): Relación porcentual entre VSL y VCL ($\text{VSL} / \text{VCL} \times 100$). Indica la rectitud de la trayectoria curvilínea.

Índice de Rectitud (STR, %): Relación porcentual entre VSL y VAP ($\text{VSL} / \text{VAP} \times 100$), indica la rectitud de la trayectoria media.

Índice de Oscilación (WOB, %): Relación porcentual entre VAP y VCL ($\text{VAP} / \text{VCL} \times 100$). Es una medida de la oscilación de la trayectoria curvilínea respecto de la trayectoria media.

Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, $\mu\text{m/s}$): Mide el máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.

Frecuencia de cruces (BCF, Hz): Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea media en función del tiempo.

2.5 Diluyentes para el semen de verraco.

Un diluyente es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de

fertilidad adecuado (Valencia 2006). El semen del verraco puede ser preservado in Vitro en forma líquida o congelada, el uso de semen congelado continúa siendo muy limitado con respecto al uso de semen fresco diluido, debido principalmente a su baja fertilidad, como consecuencia de su sensibilidad al frío (Ochoa et al, 2008). Un avance en la criopreservación, marco el descubrimiento de las propiedades crioprotectores del glicerol en diferentes especies domésticas. Se pudo identificar una peculiar sensibilidad del semen porcino al enfriamiento y las subsecuentes investigaciones solo han hecho mejoras relativamente pequeñas a las técnicas establecidas a principios de los años 50 (Juárez, 2009). Gadea (2003), señala que para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de las células espermáticas mediante la dilución en un medio adecuado y reducción de la temperatura, también es necesario tomar en cuenta la temperatura de conservación, pues cuando se reduce la temperatura los movimientos de aquellos fosfolípidos que componen la membrana se ven reducidos y se producen separaciones de fases lipídicas, que a su vez repercuten en alteraciones irreversibles de las proteínas presentes en la membrana, por lo tanto su funcionalidad y la viabilidad celular se ve comprometida.

El diluyente no es capaz de prevenir totalmente los cambios que acontecen en el espermatozoide y que afectan a su funcionalidad. Así, el semen diluido refrigerado y conservado varios días muestra cambios morfo-funcionales similares a los del proceso de envejecimiento natural y la intensidad de este proceso puede estar influenciada por las condiciones y el periodo de conservación (Rath y Cols, 2009).

Durante la conservación, el espermatozoide porcino experimenta cambios como la disminución de la movilidad, viabilidad, actividad mitocondrial y alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática (Huo y Cols, 2002).

Los mecanismos moleculares responsables del deterioro espermático durante la conservación *in vitro* no son del todo conocidos. En los últimos años ha habido un interés cada vez más creciente en el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las funciones espermáticas y en la capacidad fecundante durante la conservación. La conservación de los espermatozoides (tanto durante la conservación en refrigeración a largo plazo como en la congelación) produce estrés oxidativo. Debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo, la fase lipídica de la membrana puede ser dañada. Estos cambios de la membrana pueden estar equilibrados por el efecto protector de los antioxidantes seminales como el superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión peroxidasa (GPx) (Johnson y Cols, 2000).

2.5.1 Características y funciones de los diluyentes.

Se puede mencionar que la característica principal de los diluyentes es mantener viable la célula espermática lo mejor posible por un tiempo determinado. En base a su composición genérica los diluyentes deben cumplir las siguientes funciones: proporcionar la energía para el metabolismo de los espermatozoides, neutralizar residuos metabólicos, mantener el equilibrio osmótico y estabilizar las membranas de los espermatozoides. La importancia de conocer la composición de los diluyentes de semen porcinos, radica en que está relacionada con la fertilidad, ya que la misma se reduce, a medida que aumenta la conservación del líquido seminal, además de la influencia de la calidad del semen y el número de espermatozoides (Hernández, 2009).

2.5.2 Componentes de los diluyentes.

Glucosa, para proporcionar energía, y por su valor energético es la más utilizada, aunque también se puede emplear galactosa, fructosa, ribosa o trehalosa sin que los resultados hayan superado a la glucosa. Un estudio realizado por Diaz (2006), muestra que la glucosa es el monosacárido utilizado preferentemente por los espermatozoides de cerdo.

Admin (2014) cita que, TES, HEPES, MOPS, TRIS, son utilizados como taponadores, aunque los más usados actualmente son HEPES y MOPS, pues tienen la capacidad de regular el pH seminal en un rango más amplio evitando así, la reducción del metabolismo energético de los espermatozoides y su motilidad, mejorando de esta manera su capacidad para fertilizar y no son dependientes de la temperatura. Por otra parte, existen otros como bicarbonato y el citrato sódico que poseen capacidad tampón limitada. Sales de iones inorgánicos, como el cloruro sódico y potásico, empleadas como reguladoras de la presión osmótica, pues es conocido que una caída de la misma por debajo de los 200 mOsm representa una reducción significativa de la motilidad espermática.

Antibióticos, entre ellos los aminoglucósidos principalmente gentamicina, neomicina, y la kanamicina en concentraciones próximas a los 200 mg/L. También se está aplicando una nueva generación de antibióticos (ceftiofur, apramycina, etc.), sin que existan aún resultados concluyentes sobre su uso. Debemos tener presente que la UE, Directiva 90/429/CEE regula el uso de combinaciones entre antibióticos eficaces contra leptospira y micoplasma, con una concentración que debe tener al menos un efecto equivalente a las concentraciones mínimas de 500 UI de Estreptomina/ml, 500 UI de penicilina/ml, 150 mg de lincomicina/ml, 300 mg de espectinomicina/ml (Admin, 2014 ; Gadea, 2003).

2.5.3 Tipos de diluyentes por su duración.

A nivel de mercado los diluyentes se clasifican por su composición, pudiendo ser de corto, y/o largo plazo de conservación; las fuentes de energía y los electrolitos que se añaden a ellos son muy generales, por ello lo que marca la diferencia al momento de obtener un diluyente, son los sistemas tampón y los compuestos que se añaden para estabilizar las membranas de células espermáticas (Admin, 2014).

Se han realizado algunos esfuerzos para el desarrollo de diluyentes o técnicas de conservación para extender el periodo de vida útil de los espermatozoides por encima de las 48 horas, observándose una caída de la calidad seminal a lo largo del tiempo, que puede ser parcialmente compensado con el incremento del número de espermatozoides en términos de fertilidad, pero difícilmente en términos de prolificidad (Roca et al., 2000; López et al., 2005; Aksoy et al., 2008).

En investigación realizada por Condoy (2017), utilizando diluyentes en inseminación artificial porcina, en cuanto a fertilidad y prolificidad, obtuvo resultados no significativos entre los 3-4 primeros días de conservación del semen, presentando cierto grado de ventaja los diluyentes de larga duración, puesto que permiten conservar el semen del verraco hasta 7 días o más, con un gran porcentaje de fertilidad.

Alemán, Alfaro y Hurtado (2007), señalan que la conservación del semen refrigerado depende principalmente del diluyente, ya que contribuye a preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo el nivel de fertilidad del eyaculado. El semen refrigerado se puede conservar entre 15 y 18 °C. Estas temperaturas son las más utilizadas tanto en los centros de inseminación artificial como en las explotaciones porcinas. Además, el uso de BTS (diluyente ampliamente conocido en Europa y actualmente en

Venezuela) permite mantener viable el material espermático a 17 °C alrededor de 5 días, con un porcentaje de preñez en muchos casos superior al 80 %. Entre los diluyentes de semen porcino a corto plazo más utilizados e investigados constan el DICIP, D16 y el BTS. Del tipo de la fórmula BTS pero con variantes, se utilizan generalmente para conservaciones no superiores a 48-72 horas con semen refrigerado (Le Coz, 2007).

2.5.4 Diluyentes a corto plazo.

El citrato de sodio-yema de huevo, considerado como diluyentes de primera generación, fue diseñado originalmente para la conservación de semen bovino, y luego se empleó para la conservación de semen porcino por un periodo de 24 horas manteniendo una tasa de motilidad espermática de alrededor del 61% (Conejo et al., 1996).

Yema de huevo-glucosa, este diluyente fue utilizado en Bélgica y Checoslovaquia, se determinó que causa hinchazón de acromosomas, y deterioro en la motilidad y sobrevivencia espermática (Condoy, 2017).

Leche descremada y en polvo, también fue utilizada como conservador de semen porcino, pudiendo utilizar leche fresca entera la misma que tiene una sustancia espermicida, la lactenina, debiendo hervir la leche a 95°C por 10 minutos para poder inactivarla (Conejo et al., 1996).

2.5.5 Diluyentes a largo plazo.

EL MR-A, desarrollado en España por Santiago Rillo y Eulogio Alias, considerado como diluyente de larga duración, el mismo ha dado buenos resultados cualitativos (Rueda, 2011). Los medios ZORVPA y Reading, entre su composición tienen alcohol de polivinilo

que les permite mejorar el porcentaje de acrosomas intactos, pero no superan los resultados obtenidos de otros diluyentes por lo tanto su uso no se ha extendido (Codoy, 2017).

NUTRIXcell Ultra, considerado como un diluyente de larga duración, proporciona a los espermatozoides los nutrientes y elementos necesarios para la integridad de la membrana y el metabolismo, así mismo los protege del choque térmico, variaciones del Ph, crecimiento bacteriano, oxidación, y más. (IMV technologies, 2019). A pesar de las precauciones tomadas durante la transferencia, el semen nunca está a salvo del choque térmico que puede causar daño a los espermatozoides, este diluyente, protege los espermatozoides del estrés y mantiene la calidad del semen incluso después del estrés térmico. Otra característica del Nutricell Ultra es poseer un bioactivador, que es un compuesto biológico que amplifica la biosíntesis de los factores activadores de plaquetas, también conocido como PAFs (platelet-activating factor). Los PAFs estimulan la motilidad de los espermatozoides, promueven la penetración del óvulo y, en última instancia, mejoran la fertilidad. A pesar de las precauciones tomadas durante la transferencia, el semen nunca está a salvo del choque térmico que puede causar daño a los espermatozoides. NUTRIXcell Ultra protege los espermatozoides del estrés y mantiene la calidad del semen incluso después del estrés térmico.

2.5.6 Causas de la degradación del semen en la conservación.

Estrés oxidativo durante la conservación del semen: Chihuilaf et al. (2002), Venéreo (2002) y Olgún et al. (2004) definieron el estrés oxidativo como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas. El estrés oxidativo

de los espermatozoides se refiere al daño que pueden sufrir en la integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos provocado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres. Las principales ROS que se conocen y que tienen relación con la funcionalidad espermática son: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , precursor del radical hidroxilo) y la mayoría de radicales hidroxilos ($-OH$), cuya presencia en el ambiente espermático se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos.

Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos perjudiciales por la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual provoca acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis (Hicks et al., 2006). Los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo y particularmente a la peroxidación lipídica (LOP) debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la membrana plasmática (Venéreo, 2002). Los productos finales de la LOP son lípidos peroxidados que, al degradarse, originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). Cuando se produce la LPO se pierde el 60% de los ácidos grasos de membrana (Jones et al., 1979), lo que conlleva a la pérdida de la integridad de ésta, alterándose la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica de la membrana, produciéndose finalmente la muerte celular.

Efecto de antioxidantes añadidos al semen: Todas las células aeróbicas poseen sustratos y enzimas para neutralizar las especies reactivas de oxígeno potencialmente tóxicas. Los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo (Jones y Mann, 1977) y, aunque están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos

de las ROS, sus defensas antioxidantes son relativamente débiles. Chihuilaf et al. (2002) y Membrillo et al. (2003) definieron los antioxidantes como moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones. La función de un antioxidante, según Hicks et al. (2006) es actuar como un donador de electrones, capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción o, como indicó Venéreo (2002), sacrifica su propia integridad molecular para así evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas, ADN, entre otras, funcionalmente vitales. Entre los antioxidantes naturales se distinguen los antioxidantes enzimáticos y los antioxidantes no enzimáticos. El grupo de antioxidantes enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos mediante la acción de enzimas que utilizan como poder reductor el fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADPH) producido en diferentes vías metabólicas, como la de las pentosas fosfato en el paso catalizado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Los espermatozoides del epidídimo están protegidos por cinco enzimas con acción antioxidante: glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Membrillo et al., 2003). Las más implicadas en el daño por ROS son tres: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el sistema glutatión peroxidasa/reductasa (Álvarez et al., 1987; Griveau et al., 1995; Jeulin et al., 1989).

Melatonina y sus propiedades protectoras: La melatonina, o N-acetil-5-metoxitriptamina, es una hormona sintetizada por los pinealocitos a partir del neurotransmisor serotonina. La serotonina (5'-hidroxitriptamina) alcanza sus mayores concentraciones en la glándula pineal. Los mayores picos de secreción se originan en la oscuridad y los menores en las horas de luz. Esto es debido a que el paso limitante de la

síntesis de melatonina es la enzima NAT (N-acetil transferasa). Esta enzima, encargada de convertir la serotonina a N-acetil serotonina, tiene menor actividad por el día y mayor por la noche. La hidroxil-indol metil transferasa (HOMT) termina el ciclo con la síntesis de melatonina. Una vez que se estimula, el pinealocito secreta melatonina a la sangre, donde se transporta unida a albúmina (65%) o bien en estado libre (35%). La melatonina modula una cantidad diversa de procesos fisiológicos incluyendo el ciclo circadiano (Reiter, 1991), el control de la temporada reproductiva (Reiter, 1980), la fisiología retiniana (Dubocovich et al., 1997), regulación de la presión arterial (Doolen et al., 1998), la regulación del sistema inmune (Guerrero y Reiter, 2002), la oncogénesis (Reiter, 2003) y el crecimiento y desarrollo de tumores (Blask et al., 2002), entre otros. Gran parte de las investigaciones relacionadas con la melatonina y la glándula pineal en los primeros 30 años después de su descubrimiento, estuvieron relacionadas con su capacidad para modular la fisiología reproductiva en mamíferos de reproducción estacional, dependientes del fotoperiodo (Kitay, 1954; Reiter, 1973; Reiter y Hester, 1966; Stetson et al., 1975; Turek et al., 1976). Es posible que su función inicial en formas de vida primitivas se vincule a su actividad antioxidante en relación a los radicales libres (aniones superóxidos, radicales peroxilos, radicales catiónicos, fotooxidantes y radicales hidroxilos), producidos en las bacterias por reacciones fotoquímicas y en las plantas como consecuencia inevitable de la fotosíntesis. Las concentraciones de melatonina en estas formas de vida son unas 1.000 – 10.000 veces mayores que las presentes en el hombre. Más de 1.000 publicaciones han confirmado la capacidad de la melatonina y sus metabolitos para reducir el estrés oxidativo in vivo (Hardeland, 2005). Se ha demostrado que la melatonina elimina especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Peyrot y Ducrocq, 2008; Tan et al., 2007) en varios orgánulos subcelulares y estimula las enzimas antioxidantes (Reiter et al., 2000; Rodriguez et al.,

2004). Estas funciones de la melatonina con un efecto ubicuo como antioxidante tienen implicaciones para el funcionamiento óptimo de las células y órganos, incluyendo el sistema reproductivo (Tamura et al., 2008). La detección de sitios de unión para la melatonina en espermatozoides puede verse limitada como consecuencia de la ocultación de éstos por residuos de ácido siálico. Van Vuuren et al. (1992) investigaron la existencia de sitios de unión de la melatonina en espermatozoides humanos. Parece ser que el ácido siálico impide la unión de la melatonina a sus receptores y por lo tanto inhibe cualquier efecto que la melatonina pueda tener sobre la motilidad del espermatozoide (Van Vuuren et al., 1992). Se ha informado sobre la presencia de neuraminidasa en espermatozoides de mamíferos (Srivastava et al., 1970). Se ha sugerido que esta enzima está implicada en la reacción de la zona pelúcida del óvulo durante la fecundación (Srivastava y Abou-Issa, 1977).

Los resultados de Van Vuuren et al. (1992) demostraron que la neuraminidasa, además, podía ser responsable de la eliminación de residuos de ácido siálico en espermatozoides. Se llegó a la conclusión de que el ácido siálico y la neuraminidasa en el semen pueden por lo tanto controlar los efectos de la melatonina y posiblemente también los efectos de otras hormonas en los espermatozoides. Los efectos *in vitro* de la melatonina sobre la actividad hialuronidasa de semen, la motilidad y la anormalidad morfológica fueron investigados en los espermatozoides de toros (Tanyildizi et al., 2006).

El ácido hialurónico es un componente del cumulus oophorus de las células foliculares, que es degradado por la hialuronidasa espermática localizada en la superficie de la membrana del espermatozoide y en el interior de la membrana acrosomal (Tanyildizi y Bozkurt, 2003). Esta enzima tiene un papel importante en el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida (Meyers, 2001). Se ha demostrado que la actividad hialuronidasa

del semen es un índice de la capacidad fecundante y su deficiencia provoca una disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides en la fecundación in vitro (Abdul-Aziz et al., 1996). El resultado es que la melatonina causa un efecto significativo, disminuyendo la motilidad de los espermatozoides y provocando un incremento en la actividad hialuronidasa del semen. El aumento de la actividad hialuronidasa es independiente de la disminución de la motilidad espermatozoides. Esta conclusión ya la determinaron Tanyildizi y Bozkurt (2003), quienes sugirieron que no hay ninguna relación entre la actividad hialuronidasa y la motilidad del esperma.

2.5.7 Evaluación espermática por Fluorescencia.

La membrana espermática (ME) es una estructura heterogénea y dinámica que presenta 5 dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola, además; participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del oocito (Hammerstedt et al, 1998). La integridad de la ME es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible en varios eventos involucrados en la fecundación, como lo son la capacitación, la reacción 43crosómica y la fusión con el oocito, lo cual, garantiza la fertilidad del macho reproductor (Rubio-Guillén et al, 2009). El yoduro de propidio (PI) es una tinción nuclear y por lo mismo sirve como tinción espermática de contraste. En combinación, permiten una evaluación rápida, simple y sin ambigüedad de la presencia o ausencia del saco acrosomal, es un agente intercalante-fluorescente que se puede usar para teñir células y ácidos nucleicos (Arias, 2015). El PI se une al ADN intercalando entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia. Cuando está en una solución acuosa, el

PI tiene un máximo de excitación fluorescente de 493 nm (azul-verde) y un máximo de emisión de 636 nm (rojo). En general, las pruebas espermáticas ideales deberían ser sencillas, rápidas de interpretar, confiables, repetibles y debieran aportar información relevante (Bavister, 1990). Durante la congelación y descongelación, el esperma sufre daños oxidativos y osmóticos que pueden cambiar la estructura lipídica de la membrana. Estos cambios conducen a la muerte espermática o modificaciones subletales que reduce más del 30% en la viabilidad de la población espermática tras la descongelación. (Arias, 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Físicos

Tabla 1. *Materiales Físicos*

DESCRIPCIÓN	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD
Equipo CASA -SCA Evolution 2018® (Microptic, S.A., Spain)	UNIDAD	1
Microscopio Nikon de contraste de fases	UNIDAD	1
Micro centrifugadora 1,5 ml	UNIDAD	1
Balanza de precisión	UNIDAD	1
Incubadora	UNIDAD	1
Platina térmica	UNIDAD	1
Pipetas de 5 a 10 ul, 200 ul y 1000 ul.	UNIDAD	3
Cámara de flujo laminar	UNIDAD	1
Termómetro	UNIDAD	1
Tubos Falcon de 15 ml	UNIDAD	5
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	UNIDAD	50
Frasco recolector de semen porcino	UNIDAD	1
Porta objetos	UNIDAD	300
Cubre objetos	UNIDAD	300
Material de vidrio (vasos de precipitación, probetas, varillas)	UNIDAD	varios
Espátulas	UNIDAD	2
Caja térmica	UNIDAD	1
Termo transportable	UNIDAD	1
Guantes para la recolección de semen	UNIDAD	20
Overol	UNIDAD	1

3.1.2 Biológicos

Tabla 2. *Materiales Biológicos*

DESCRIPCIÓN	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD
Muestra de semen	Volumen (ml)	35

3.1.3 Químicos

Tabla 3. *Materiales Químicos*

DESCRIPCIÓN	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD
NUTRIXcell Ultra®	Gramos (g)	30
Melatonina (Mm) (M5250)	micro molaridad (Mm)	4025
Agua mili-Q	Volumen	1
HEPES (ml)	Volumen (ml)	5
Botussemen Special®	Volumen(ml)	100

3.2 Metodología

El presente trabajo se realizó bajo un modelo de investigación de tipo experimental inductiva.

3.3 Diseño estadístico

Esta investigación usó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) en el cual evaluó el efecto de un antioxidante Melatonina (ME) sobre la cinemática espermática y viabilidad del semen porcino refrigerado a 5°C durante 7 días.

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se hizo en el programa STATISTICA versión 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK). Los datos fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar su distribución normal. El efecto de las diferentes concentraciones de ME frente al tiempo de almacenamiento del semen porcino refrigerado fue evaluado mediante un ANOVA de medidas repetidas y la prueba de comparación múltiple de Tukey 5% y 1%.

Los resultados fueron expresados en valores promedios \pm error estándar de la media (EEM) y los niveles de significancia fueron a $P < 0,05$ (diferencias significativas) y $P < 0,01$ (diferencias altamente significativas).

3.4 Población y muestra.

Se obtuvo un total de cinco eyaculados de semen de un cerdo reproductor de la raza Landrace clínicamente sano y sexualmente activo durante cinco semanas consecutivas (cinco repeticiones en cinco semanas) (Tabla 5).

Tabla 4. *Tratamientos utilizados en el experimento*

Tratamientos	Repeticiones (Semana)	Tiempo (horas)
T0 = NUTRIXcell Ultra + Semen	5	0 – 144 h
T1 = NUTRIXcell Ultra + 1 Mm de ME + Semen	5	0 – 144 h
T2 = NUTRIXcell Ultra + 10 Mm de ME + Semen	5	0 – 144 h
T3 = NUTRIXcell Ultra + 50 Mm de ME + Semen	5	0 – 144 h
T4 = NUTRIXcell Ultra + 100 Mm de ME + Semen	5	0 – 144 h

* Evaluación cada 24 h durante 7 días.

Cada eyaculado se dividió en cinco alícuotas y se diluyó con NutrixCell® Ultra suplementado con 0 (control, T0), 1 Mm (T1), 10 Mm (T2), 50 Mm (T3), y 100 Mm (T4) de Melatonina (ME) y se almacenó en frío durante 144 horas (7 días). El análisis de la cinemática y viabilidad espermática fueron realizados cada 24 horas. Se registraron cinco tratamientos (T0, T1, T2, T3 y T4), y cada tratamiento con siete momentos de evaluación (tiempo= 0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, y 144h).

3.5 Obtención de las muestras

La recolección de los eyaculados de semen del verraco se realizó mediante la técnica de la “mano enguantada”. Previo al inicio del experimento, el verraco fue entrenado para esta técnica siguiendo la metodología detallada por Kubus (2010) y Bonet et al. (2013). Durante la manipulación del animal y la obtención de las muestras se tuvo precaución sanitaria tanto de la muestra como del operador. La primera fracción del eyaculado fue descartada, debido a que este líquido no contiene esperma y la segunda fracción rica en espermatozoides fue filtrada. De la fracción rica de semen, se tomó 7,50 ml y se pre-diluyó

en una relación 1:1 con NUTRIXcell Ultra (7,50 ml) a 37°C y fue transportada al laboratorio para sus análisis y procesamiento de las muestras. El transporte se hizo en frascos estériles de 100 ml mantenidos dentro de una caja térmica a 18 °C (temperatura ambiente) (ver Fotografía 2).

Tabla 5. *Evaluación del volumen, Ph, color, y olor del semen fresco.*

Evaluación del volumen, Ph, color, y olor del semen fresco.				
Eyaculado	Volumen ml	Ph	Color	Olor
1	280	6,7	Blanco cremoso	suigéneris

Fotografía 2. Recolección de eyaculado de verraco, transporte y dilución.

	
<p>Recolección de semen de verraco, doble guante.</p>	<p>Transporte de semen en termo</p>



En el laboratorio se analizó la concentración inicial usando una cámara de Neubauer y una dilución de 1:200 (3 μ l de semen crudo + 600 μ l de solución salina formolada al 5%). El semen diluido 1:1 fue ajustado a una concentración inicial de 60×10^6 esp/ml. Se conformaron cinco alícuotas de 2,5 ml, en tubos Falcon (15 ml) c/u. Aquellos eyaculados tuvieron un volumen entre 280 – 290 ml, un pH entre 6,7 y 6,9, un color blanco cremoso y olor suigéneris (Tabla 6), que fueron usados en los análisis subsiguientes.

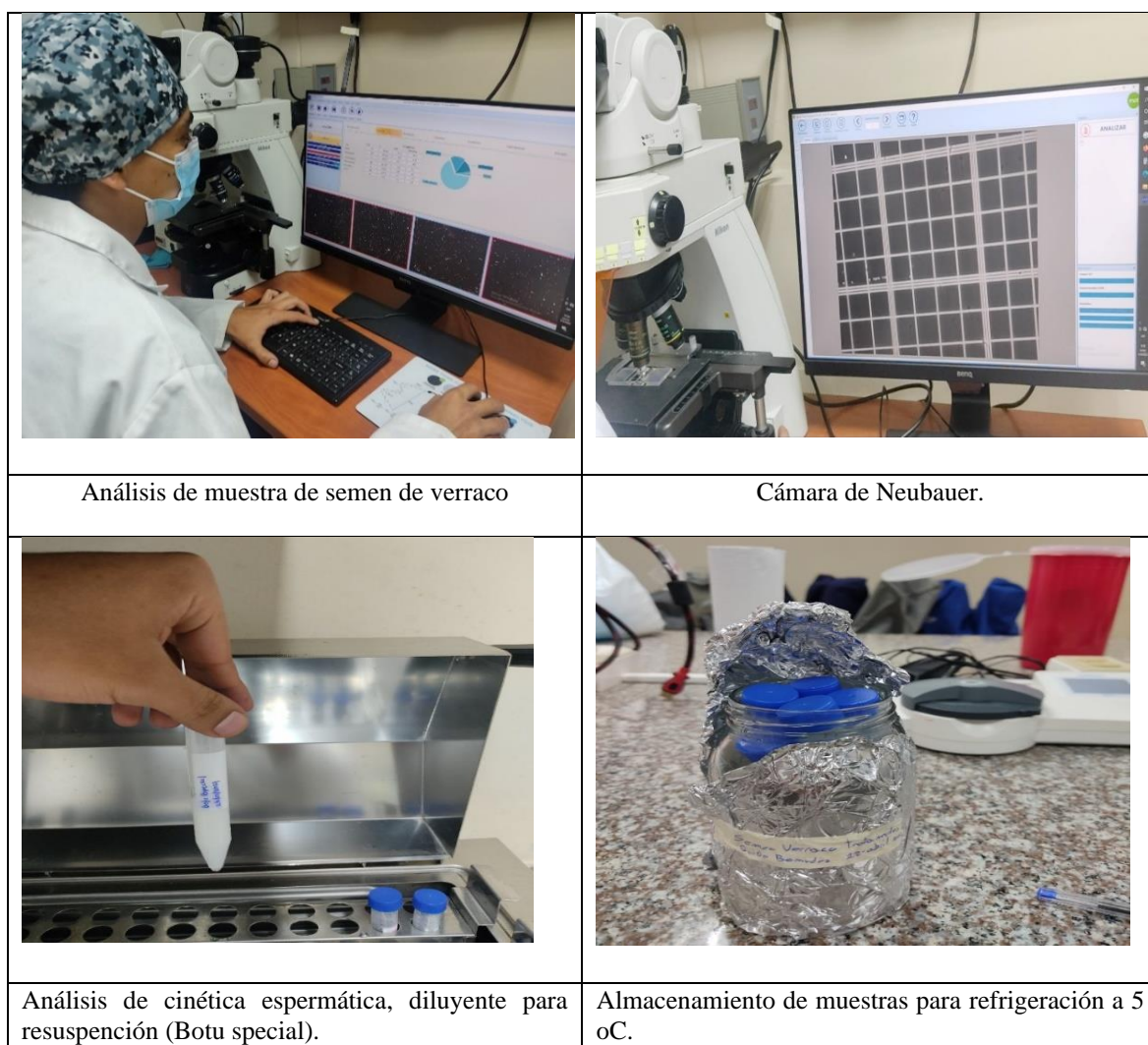
3.5.1 Preparación de los tratamientos con melatonina (ME).

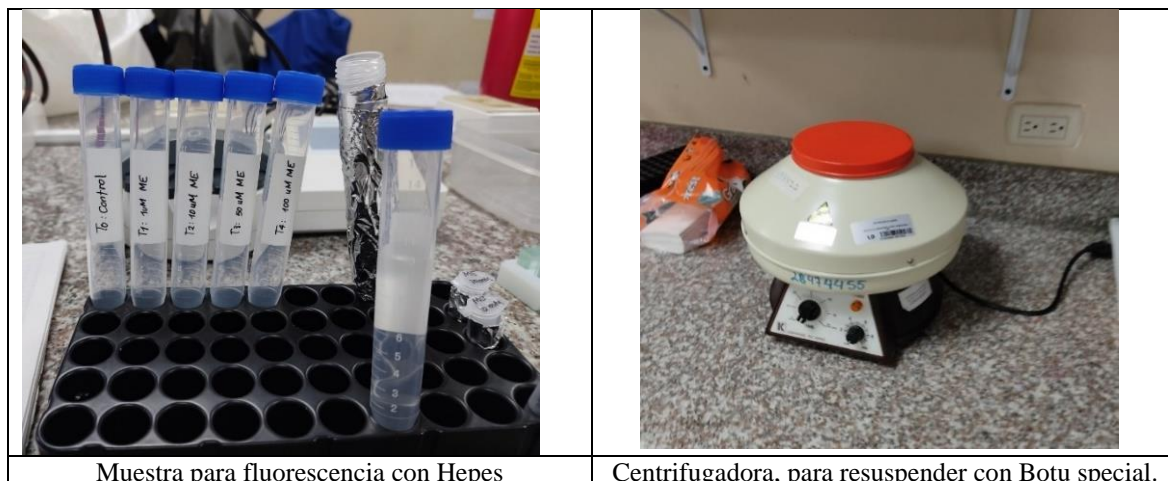
Las cinco alícuotas de 2,5 ml se utilizaron para conformar los cinco tratamientos, respectivamente. Brevemente, a cada alícuota inicial se le agregó el mismo volumen (2,5 ml) de diluyente NUTRIXcell Ultra suplementando con 0 (control), 2 μ M, 20 μ M, 100 μ M, y 200 μ M de ME. De esta manera las cinco muestras de los cinco tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 alcanzaron un volumen final de 5 ml, concentración final de 30×10^6 esp/ml y dosis final de ME de 0 (control); 1 μ M; 10 μ M; 50 μ M; y 100 μ M, respectivamente.

Las muestras espermáticas de cada tratamiento mantenidas en tubos Falcon de 15 ml, se sumergieron en agua destilada y éstos se cubrieron con papel aluminio. Todas las muestras fueron refrigeradas a 5 °C durante 7 días (144 h). Cada día (24 h) se evaluó la cinemática espermática y la integridad de la membrana plasmática (equivalente a la viabilidad) usando un sistema computarizado CASA y la tinción fluorescente de yoduro de propidio, respectivamente.

3.6 Interpretación y lecturas de las variables en estudio

Fotografía 3. *Evaluación de la cinética de semen de verraco en el Equipo CASA.*



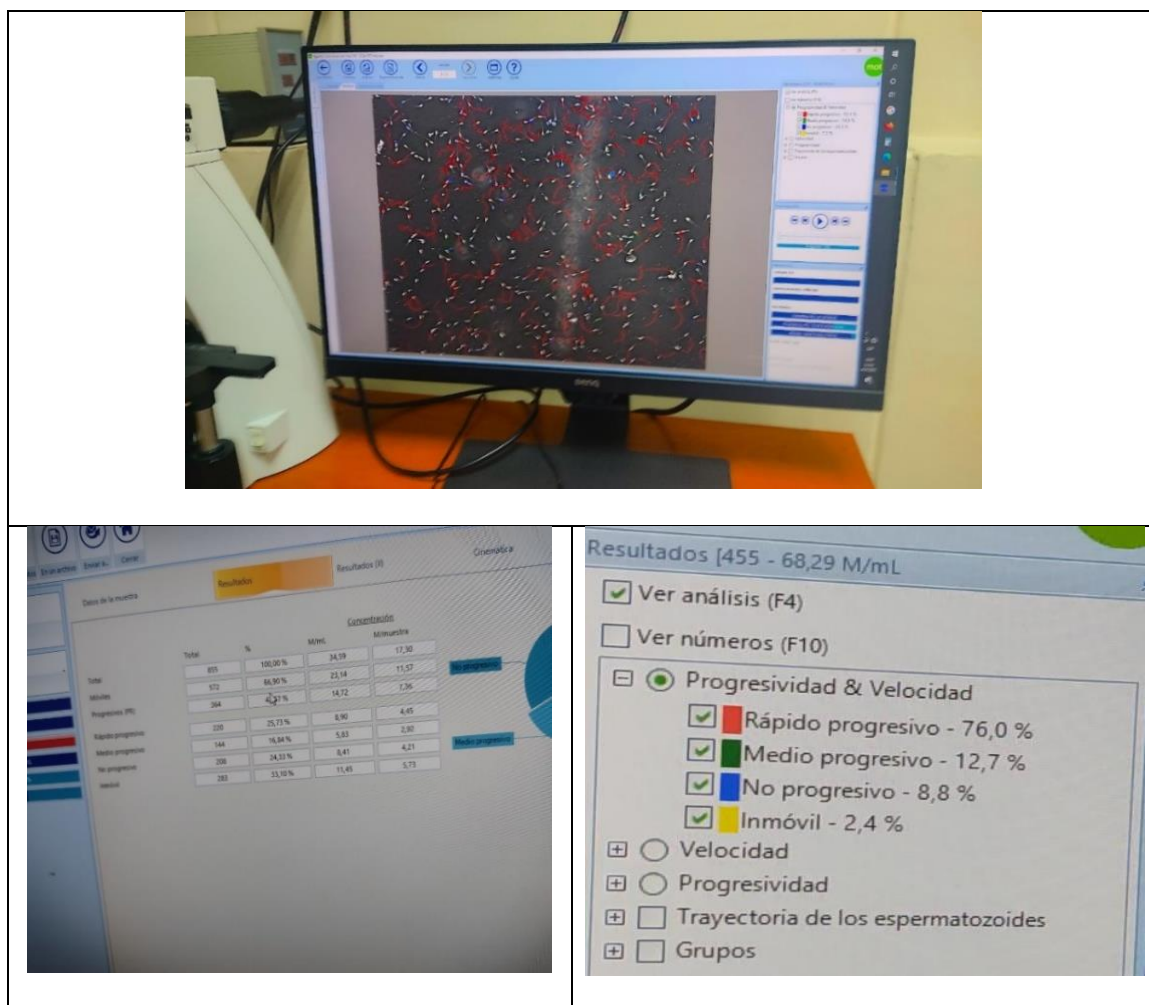


Para este propósito, diariamente las muestras fueron homogeneizadas y una fracción de 200 μ l fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Por consiguiente, cada muestra fue centrifugada a 300 gravedades (g) por 5 min y el sobrenadante fue reconstituido por los mismo 200 μ l del diluyente Botusemen-Special (Fotografía 3).

3.6.1 Evaluación de la cinemática espermática

Las características cinéticas de las muestras espermática porcinas de cada tratamiento en cada unidad de tiempo fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA.

Fotografía 4. Análisis parámetros cinéticos en el sistema CASA Sca.



CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, España) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018).

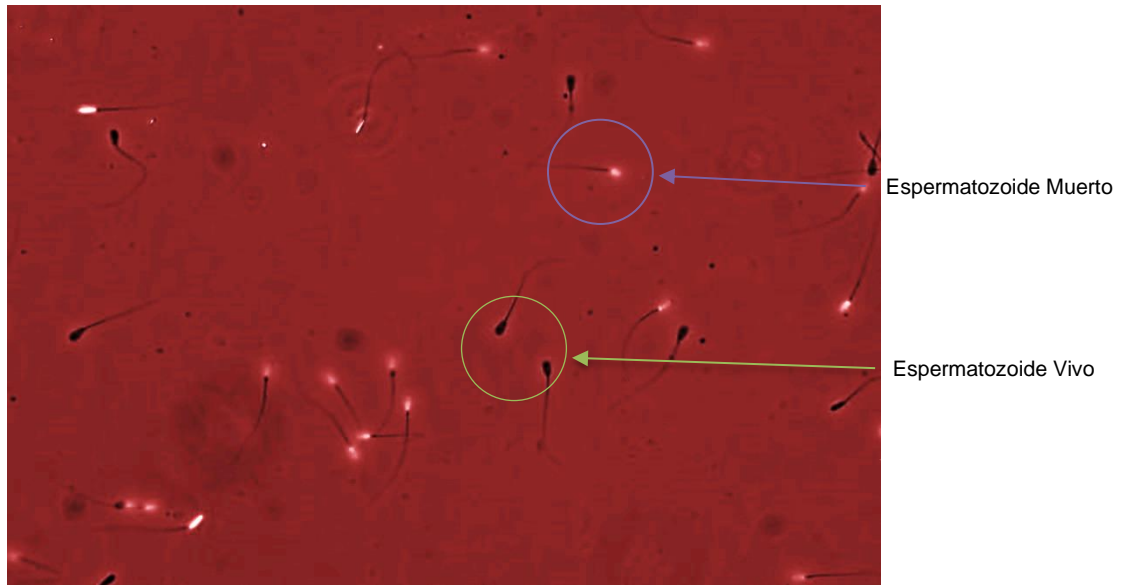
Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo) (Fotografía 4). Para la evaluación se tomó 5 μ l de la muestra por tratamiento y se colocó en un porta y cubreobjetos. Las variables cinemáticas evaluadas fueron: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad promedio (VAP, μ m/s), velocidad y

progresividad (V-P, $\mu\text{m/s}$) Linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

3.6.2 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.

Para la evaluación de la membrana plasmática equivalente a la viabilidad, se usó el medio tampón HEPES (250 μl). La tinción de fluorescencia fue a base de yoduro de propidio (PI). La manipulación de este fluorocromo fue en condiciones de oscuridad (protegida de la luz con papel aluminio). Se mezcló cada muestra espermática de cada tratamiento con el medio HEPES atemperado a 22°C y a se ajustó a una concentración de 10×10^6 esp/mL. Sin luz, se agregó 5 μl de (PI) a dicha mezcla espermática, y entonces, se tomó 5 μL de esa muestra y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia. La viabilidad de los espermatozoides fue analizada mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.). Se contó un total de 200 células espermática y se registró en porcentaje el total de espermatozoides vivos (sin reacción a fluorescencia) y muertos o con la membrana plasmática dañada (color rojo fluorescente) (Fotografía 5).

Fotografía 5. *Viabilidad espermática con fluorescencia con yoduro de propidio.*



3.7 Operacionalización de variables

3.7.1 Variables independientes.

Tabla 6. *Variables independientes: Melatonina (ME), Tiempo de almacenamiento, Semen de porcino.*

CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	INDICE
ME: es una hormona sintetizada por los pinealocitos a partir del neurotransmisor serotonina. La suplementación con melatonina (ME) al medio de refrigeración para identificar sus propiedades antioxidantes.	Químico	Cuantitativa	μM $0 \mu\text{M}$ $1 \mu\text{M}$ $10 \mu\text{M}$ $50 \mu\text{M}$ $100 \mu\text{M}$
Tiempo de almacenamiento en refrigeración a 5°C	Físico	Cuantitativa	Día 0 (0 h) Día 1 (24 h) Día 2 (48 h) Día 3 (72 h) Día 4 (96 h) Día 5 (120 h) Día 6 (144 h)
Semen: Los espermatozoides porcinos se caracterizan por un alto contenido de PUFAs y una baja concentración de colesterol. Esto los hace	Biológico	Cuantitativa	ml 7,5 ml

más sensibles al estrés, como el choque térmico.			
--	--	--	--

3.7.2 Variables dependiente

Tabla 7. *Variable dependiente: Parametros de Motilidad.*

CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADOR*	ESCALA DE MEDICIÓN
Este parámetro nos indica, tanto el porcentaje de espermatozoides móviles como una serie de detalles referentes a las características de la movilidad individual y colectiva.	Biológico	Motilidad Total (MT)	0%-100%
Porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento con un índice de rectitud (STR) \geq 75%.	Biológico	Motilidad progresiva (MP)	0% -100%
Nos aporta información sobre la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.	Biológico	Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m/s}$
Nos muestra la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.	Biológico	Velocidad de la trayectoria media (VAP)	$\mu\text{m/s}$
Nos muestra la distancia recorrida por el espermatozoide entre estos dos puntos de su trayectoria en función del tiempo.	Biológico	Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m/s}$

Nos muestra la distancia recorrida por el espermatozoide que presentan movimiento con un índice de rectitud.	Biológico	Velocidad y Progresividad (V-P)	μm/s
Indica la rectitud de la trayectoria media.	Biológico	Rectitud (STR)	0% -100%
Indica la rectitud de la trayectoria curvilínea.	Biológico	Linealidad (LIN)	0% -100%
Es una medida de la oscilación de la trayectoria curvilínea respecto de la trayectoria media.	Biológico	Oscilación (WOB)	0% -100%
Mide el máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria lineal y media.	Biológico	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	μm
Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea media en función del tiempo.	Biológico	Frecuencia de batida de flagelo (BCF)	Hz
Parámetros de valoración seminal que son el límite celular y por ser responsable de hacer efectivas las interacciones entre células, tanto en términos de integridad morfológica, como funcional.	Biológico	Integridad de la membrana plasmática (Viabilidad)	0 – 100%

*Todas las variables se determinaron en 5 tratamientos y a las 0-24-48-72-96-120-144 horas post dilución.

3.8 Toma y registro de datos

Los datos de cada tratamiento en cada unidad de tiempo registrados por el sistema CASA y aquellos obtenidos por el test de fluorescencia de fueron sistematizados en una hoja de cálculo. Estos datos sirvieron para los análisis estadísticos.

3.9 Consideraciones éticas

En esta investigación con verraco (*Sus scrofa domesticus*) se llevó a cabo aplicando el art. de la ORDENANZA MUNICIPAL PARA LA PROTECCIÓN DE LA FAUNA URBANA. La Fauna Urbana es la terminología global que para el territorio conforma: Animales destinados a compañía, Animales destinados a trabajo, oficio o asistencia, Animales destinados al consumo, Animales destinados a entretenimiento, Animales destinados a experimentación. Utilizándose el Art. 12.- La experimentación animal, que implique sufrimiento físico, está proscrita, debiendo utilizarse y desarrollarse alternativas técnicas, ceñidas a la Bioética (Carpio, 2004). En resumen, en esta investigación no se maltrató a ningún animal, ya que las muestras fueron tomadas bajo protocolos específicos para la extracción del semen porcino sin alterar el bienestar animal, ni su seguridad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de las motilidades

El análisis de la MT y MP mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los factores 'tratamiento x tiempo'. No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos en cada unidad de tiempo analizado.

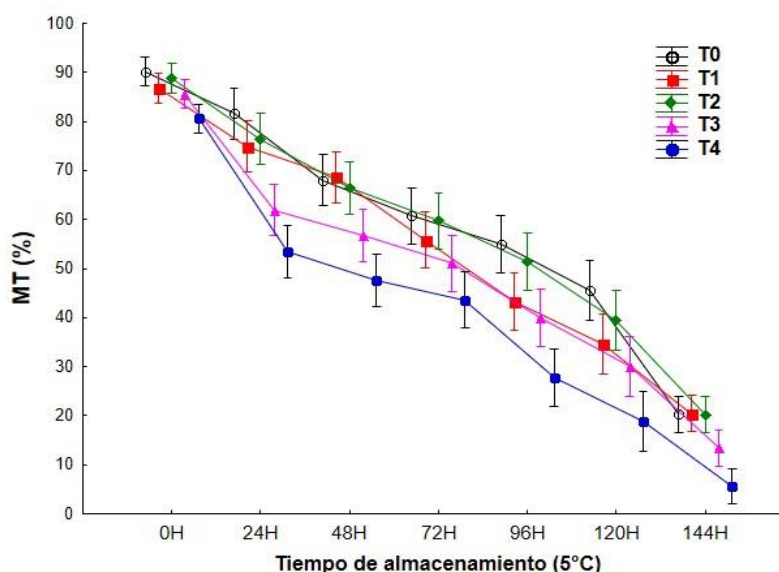


Figura 1. Porcentaje de Motilidad Total % (MT) de muestras espermáticas porcinas ($n=175$) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μM (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 45,33%.

Tabla 8. Motilidad Total % (MT): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV=45.33%

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	90.1 \pm 2.43 ^b	86.8 \pm 2.43 ^{ab}	88.8 \pm 2.72 ^b	85.5 \pm 3.05 ^{ab}	80.6 \pm 3.91 ^a
24 h	81.6 \pm 2.65 ^b	70.9 \pm 5.39 ^{ab}	76.4 \pm 4.07 ^b	61.9 \pm 4.13 ^{ab}	55.4 \pm 9.29 ^a
48 h	68.0 \pm 4.20 ^b	68.6 \pm 6.24 ^b	66.4 \pm 4.98 ^b	56.8 \pm 2.65 ^{ab}	47.6 \pm 7.18 ^a
72 h	60.7 \pm 6.48 ^b	55.8 \pm 4.98 ^{ab}	59.7 \pm 5.53 ^{ab}	51.1 \pm 3.88 ^{ab}	43.5 \pm 7.29 ^a
96 h	55.0 \pm 8.23 ^b	43.2 \pm 3.61 ^{ab}	51.3 \pm 5.19 ^b	40.0 \pm 6.17 ^{ab}	25.8 \pm 5.86 ^a
120 h	45.5 \pm 7.53 ^c	34.6 \pm 5.92 ^{bc}	39.3 \pm 6.53 ^{bc}	29.9 \pm 4.02 ^{ab}	18.8 \pm 6.04 ^a
144 h	20.3 \pm 5.36 ^{bc}	26.4 \pm 4.77 ^c	20.1 \pm 3.66 ^{bc}	13.4 \pm 3.58 ^{ab}	5.61 \pm 0.80 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c y d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,05$) según Tukey

Tabla 9. *Motilidad Total % (MT): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV=45.33%.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	90.1 \pm 2.43 ^b	86.8 \pm 2.43 ^{ab}	88.8 \pm 2.72 ^{ab}	85.5 \pm 3.05 ^{ab}	80.6 \pm 3.91 ^a
24 h	81.6 \pm 2.65 ^b	70.9 \pm 5.39 ^{ab}	76.4 \pm 4.07 ^{ab}	61.9 \pm 4.13 ^{ab}	55.4 \pm 9.29 ^a
48 h	68.0 \pm 4.20 ^b	68.6 \pm 6.24 ^b	66.4 \pm 4.98 ^{ab}	56.8 \pm 2.65 ^{ab}	47.6 \pm 7.18 ^a
72 h	60.7 \pm 6.48 ^b	55.8 \pm 4.98 ^{ab}	59.7 \pm 5.53 ^{ab}	51.1 \pm 3.88 ^{ab}	43.5 \pm 7.29 ^a
96 h	55.0 \pm 8.23 ^b	43.2 \pm 3.61 ^{ab}	51.3 \pm 5.19 ^b	40.0 \pm 6.17 ^{ab}	25.8 \pm 5.86 ^a
120 h	45.5 \pm 7.53 ^b	34.6 \pm 5.92 ^{ab}	39.3 \pm 6.53 ^b	29.9 \pm 4.02 ^{ab}	18.8 \pm 6.04 ^a
144 h	20.3 \pm 5.36 ^{ab}	26.4 \pm 4.77 ^b	20.1 \pm 3.66 ^{ab}	13.4 \pm 3.58 ^{ab}	5.61 \pm 0.80 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c y d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

Al analizar el factor tiempo, todos los tratamientos disminuyeron (P<0,05) su MT según incrementó el tiempo de almacenamiento en refrigeración (Figura 1, Tabla 8 y 9). Las muestras refrigeradas con T1 disminuyeron su MT a partir de las 72 h de refrigeración; las muestras de T0 y T2, disminuyeron la MT a las 48 h, y las muestras de T3 y T4 a las 24 h. El T1 preservó mejor la MT comparado con los otros tratamientos. Mejía y Párraga (2019), señalan que el declive gradual de la motilidad espermática con relación al tiempo de conservación, se debe probablemente al efecto de peroxidación que ocurre en los espermatozoides.

En relación del CV del 45.33% para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis.

Una disminución significativa (P<0,05) del Porcentaje de Motilidad Progresiva % MP fue evidenciado con el T4 en comparación con el T0 (control) a las 24h y 48h de

refrigeración. Al analizar el factor tiempo, todos los tratamientos disminuyeron ($P < 0,05$) su MP según incrementó el tiempo de refrigeración. Las muestras refrigeradas con T0 disminuyeron su MP a partir de las 48 h de almacenamiento. Sin embargo, las muestras de T1-T2-T3-T4, disminuyeron la MP a las 24 h (Figura 2, Tabla 10 y 11). El efecto antioxidante de la ME no fue evidenciada en la motilidad progresiva. No presento DS ($P > 0,01$).

En relación del CV del 53.70% para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de analisis.

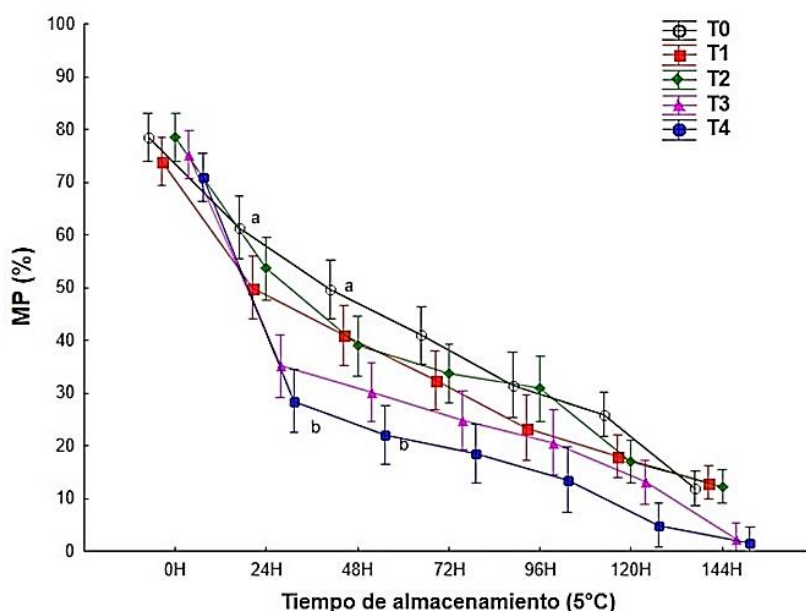


Figura 2. Porcentaje de Motilidad Progresiva % (MP) de muestras espermáticas porcinas ($n=175$) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μM (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 53,70%.

Tabla 10. *Motilidad Progresiva % (MP): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 53.70%.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	78.5 ± 3.88 ^c	73.8 ± 4.27 ^{bc}	78.3 ± 5.18 ^c	75.1 ± 4.32 ^{ab}	70.9 ± 4.97 ^a
24 h	61.2 ± 4.58 ^c	47.9 ± 7.13 ^{bc}	53.6 ± 5.48 ^c	35.1 ± 5.55 ^{ab}	28.4 ± 6.48 ^a
48 h	49.7 ± 5.69 ^c	40.9 ± 3.85 ^{bc}	38.8 ± 6.59 ^c	30.2 ± 6.48 ^{ab}	22.0 ± 4.87 ^a
72 h	40.9 ± 6.57 ^c	32.3 ± 3.67 ^{bc}	33.6 ± 6.06 ^{bc}	24.8 ± 5.65 ^{ab}	18.4 ± 5.17 ^a
96 h	31.4 ± 8.16 ^b	23.3 ± 4.5 ^{ab}	30.8 ± 6.44 ^b	20.5 ± 5.72 ^{ab}	13.5 ± 5.56 ^a
120 h	25.9 ± 7.39 ^b	18.0 ± 3.32 ^b	17.0 ± 3.15 ^{ab}	13.1 ± 2.68 ^{ab}	4.9 ± 1.54 ^a
144 h	11.8 ± 4.91 ^{abc}	13.0 ± 3.26 ^c	12.2 ± 4.06 ^{bc}	2.1 ± 0.65 ^{ab}	1.4 ± 0.33 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c y d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 11. *Motilidad Progresiva % (MP): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 53.70%.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	78.5 ± 3.88 ^c	73.8 ± 4.27 ^{bc}	78.3 ± 5.18 ^c	75.1 ± 4.32 ^{ab}	70.9 ± 4.97 ^a
24 h	61.2 ± 4.58 ^c	47.9 ± 7.13 ^{bc}	53.6 ± 5.48 ^{bc}	35.1 ± 5.55 ^{ab}	28.4 ± 6.48 ^a
48 h	49.7 ± 5.69 ^c	40.9 ± 3.85 ^{bc}	38.8 ± 6.59 ^{ab}	30.2 ± 6.48 ^{ab}	22.0 ± 4.87 ^a
72 h	40.9 ± 6.57 ^c	32.3 ± 3.67 ^{bc}	33.6 ± 6.06 ^{bc}	24.8 ± 5.65 ^{ab}	18.4 ± 5.17 ^a
96 h	31.4 ± 8.16 ^b	23.3 ± 4.5 ^{ab}	30.8 ± 6.44 ^b	20.5 ± 5.72 ^{ab}	13.5 ± 5.56 ^a
120 h	25.9 ± 7.39 ^b	18.0 ± 3.32 ^{ab}	17.0 ± 3.15 ^{ab}	13.1 ± 2.68 ^{ab}	4.9 ± 1.54 ^a
144 h	11.8 ± 4.91 ^{abc}	13.0 ± 3.26 ^c	12.2 ± 4.06 ^{bc}	2.1 ± 0.65 ^{ab}	1.4 ± 0.33 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c y d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

4.2 Evaluación de las velocidades

Al analizar las velocidades curvilíneas (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) se evidenciaron diferencias significativas (P<0,05), únicamente en el factor 'tiempo'. No se registró diferencias significativas (P>0,05) entre en ningún tiempo analizado. Si embargo,

todos los tratamientos disminuyeron significativamente ($P<0,05$) sus velocidades según incrementó el tiempo de refrigeración.

En relación del CV del 42.49 % para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis y temperatura.

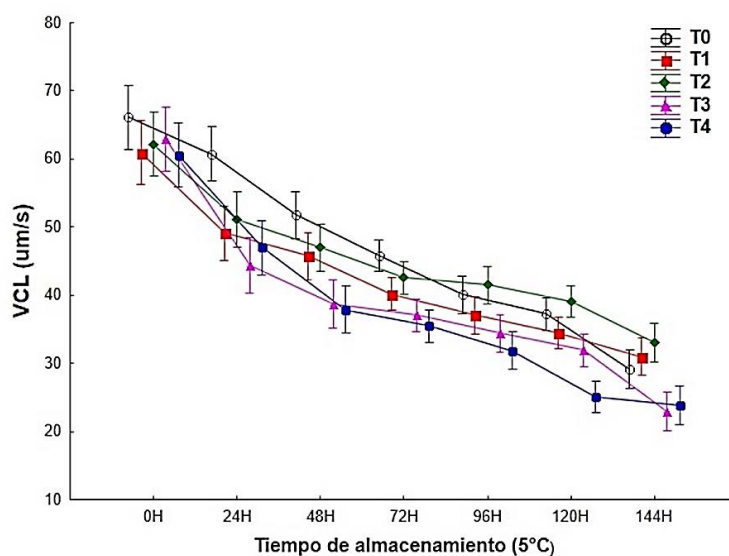


Figura 3. Porcentaje de Velocidad Curvilínea $\mu\text{m/s}$ (VCL) de muestras espermáticas porcinas ($n=175$) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μM (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 42,49%.

Las muestras refrigeradas con T0-T2 disminuyeron el Porcentaje de Velocidad Curvilínea $\mu\text{m/s}$ (VCL) a las 48 h de almacenamiento; mientras que las muestras de T3-T4 disminuyeron la VCL a las 24 h de refrigeración (Figura 3, Tabla 12 y 13).

En relación del CV del 42.49 % para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis y temperatura.

Tabla 12. *Porcentaje de Velocidad Curvilínea $\mu\text{m/s}$ (VCL): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 42.49 %.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	66.1 \pm 3.46 ^b	60.9 \pm 5.09 ^a	62.1 \pm 7.21 ^a	62.9 \pm 3.01 ^a	60.5 \pm 3.39 ^a
24 h	60.7 \pm 2.90 ^b	49.0 \pm 4.76 ^a	51.1 \pm 5.26 ^a	44.3 \pm 4.12 ^a	47.0 \pm 2.33 ^a
48 h	51.7 \pm 3.97 ^b	45.7 \pm 4.31 ^{ab}	46.9 \pm 4.12 ^{ab}	38.7 \pm 2.78 ^a	37.8 \pm 0.99 ^a
72 h	45.7 \pm 2.37 ^b	40.1 \pm 1.44 ^{ab}	42.5 \pm 2.83 ^{ab}	37.0 \pm 3.07 ^a	35.4 \pm 1.73 ^a
96 h	40.0 \pm 3.16 ^{ab}	37.0 \pm 1.78 ^{ab}	41.4 \pm 3.31 ^b	34.4 \pm 3.54 ^{ab}	31.8 \pm 1.16 ^a
120 h	37.2 \pm 1.33 ^b	34.4 \pm 1.44 ^{ab}	39.0 \pm 3.37 ^b	31.9 \pm 3.06 ^{ab}	25.1 \pm 1.72 ^a
144 h	35.1 \pm 6.33 ^b	30.9 \pm 1.38 ^{ab}	33.0 \pm 2.26 ^b	26.9 \pm 3.78 ^{ab}	23.8 \pm 1.89 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c y d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 13. *Porcentaje de Velocidad Curvilínea $\mu\text{m/s}$ (VCL): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 42.49 %.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	66.1 \pm 3.46 ^b	60.9 \pm 5.09 ^a	62.1 \pm 7.21 ^a	62.9 \pm 3.01 ^a	60.5 \pm 3.39 ^a
24 h	60.7 \pm 2.90 ^b	49.0 \pm 4.76 ^{ab}	51.1 \pm 5.26 ^{ab}	44.3 \pm 4.12 ^a	47.0 \pm 2.33 ^a
48 h	51.7 \pm 3.97 ^b	45.7 \pm 4.31 ^{ab}	46.9 \pm 4.12 ^{ab}	38.7 \pm 2.78 ^a	37.8 \pm 0.99 ^a
72 h	45.7 \pm 2.37 ^b	40.1 \pm 1.44 ^{ab}	42.5 \pm 2.83 ^{ab}	37.0 \pm 3.07 ^{ab}	35.4 \pm 1.73 ^a
96 h	40.0 \pm 3.16 ^{ab}	37.0 \pm 1.78 ^{ab}	41.4 \pm 3.31 ^b	34.4 \pm 3.54 ^{ab}	31.8 \pm 1.16 ^a
120 h	37.2 \pm 1.33 ^{ab}	34.4 \pm 1.44 ^{ab}	39.0 \pm 3.37 ^b	31.9 \pm 3.06 ^{ab}	25.1 \pm 1.72 ^a
144 h	35.1 \pm 6.33 ^b	30.9 \pm 1.38 ^{ab}	33.0 \pm 2.26 ^b	26.9 \pm 3.78 ^{ab}	23.8 \pm 1.89 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c y d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

Las muestras refrigeradas con T1 disminuyeron (P<0,05) su Velocidad promedio (VAP) a las 48 h de almacenamiento; mientras que las muestras del resto de tratamientos (T0-T2-

T3-T4), disminuyeron ($P<0,05$) la VAP más pronto, a partir de las 24 h (Figura 4, Tabla 14 y 15).

En relación del CV del 58,08 % para este tipo de investigación está alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis y temperatura.

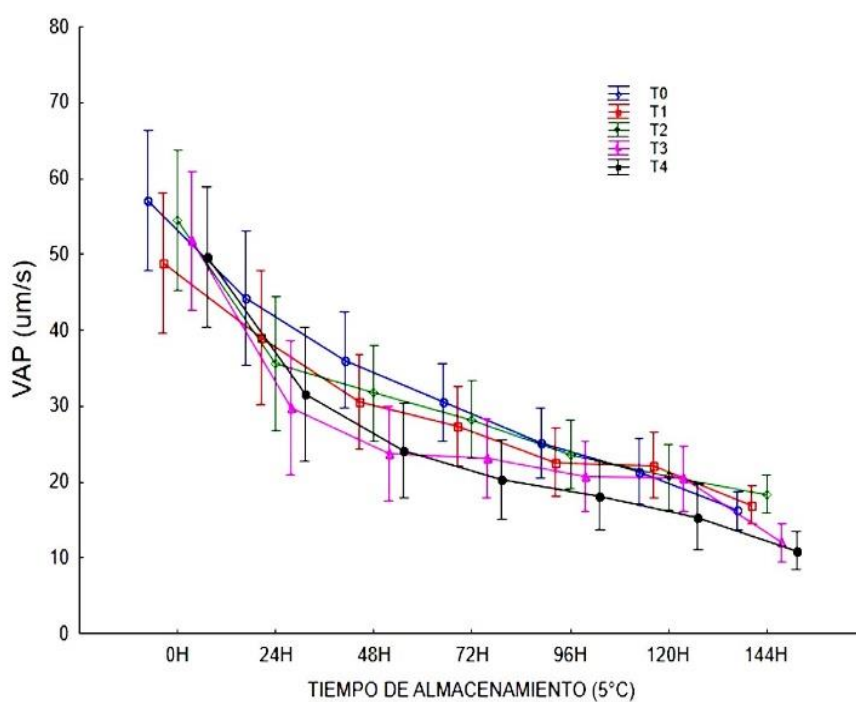


Figura 4. Velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$) de muestras espermáticas porcinas ($n=175$) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μM (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 58,08.

Tabla 14. Porcentaje Velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV= 58.08 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	57.1 \pm 3.07 ^b	48.8 \pm 5.34 ^{ab}	54.5 \pm 5.92 ^{ab}	51.7 \pm 3.60 ^a	49.6 \pm 3.44 ^a
24 h	44.2 \pm 3.71 ^b	38.9 \pm 5.39 ^{ab}	35.5 \pm 3.38 ^{ab}	29.7 \pm 5.54 ^a	31.5 \pm 2.15 ^a
48 h	36.0 \pm 3.38 ^b	30.5 \pm 2.76 ^b	31.6 \pm 3.44 ^b	23.6 \pm 3.27 ^a	24.1 \pm 1.96 ^a
72 h	30.4 \pm 2.62 ^c	27.4 \pm 1.59 ^{bc}	28.2 \pm 3.68 ^{bc}	23.1 \pm 2.35 ^{ab}	20.3 \pm 1.68 ^a
96 h	25.1 \pm 1.98 ^c	22.6 \pm 1.29 ^{bc}	23.5 \pm 3.41 ^{bc}	20.7 \pm 2.10 ^{ab}	18.1 \pm 1.46 ^a
120 h	21.3 \pm 1.52 ^c	22.1 \pm 0.56 ^{bc}	20.6 \pm 1.65 ^{bc}	20.4 \pm 3.51 ^{ab}	15.3 \pm 1.90 ^a
144 h	16.2 \pm 1.94 ^{bc}	16.9 \pm 1.20 ^c	18.3 \pm 1.11 ^c	11.9 \pm 1.03 ^{ab}	10.9 \pm 0.20 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,05$) según Tukey

Tabla 15. Porcentaje Velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV= 58.08 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	57.1 \pm 3.07 ^b	48.8 \pm 5.34 ^b	54.5 \pm 5.92 ^{ab}	51.7 \pm 3.60 ^a	49.6 \pm 3.44 ^a
24 h	44.2 \pm 3.71 ^b	38.9 \pm 5.39 ^b	35.5 \pm 3.38 ^{ab}	29.7 \pm 5.54 ^a	31.5 \pm 2.15 ^a
48 h	36.0 \pm 3.38 ^b	30.5 \pm 2.76 ^b	31.6 \pm 3.44 ^{ab}	23.6 \pm 3.27 ^a	24.1 \pm 1.96 ^a
72 h	30.4 \pm 2.62 ^b	27.4 \pm 1.59 ^b	28.2 \pm 3.68 ^{ab}	23.1 \pm 2.35 ^{ab}	20.3 \pm 1.68 ^a
96 h	25.1 \pm 1.98 ^c	22.6 \pm 1.29 ^b	23.5 \pm 3.41 ^{bc}	20.7 \pm 2.10 ^{ab}	18.1 \pm 1.46 ^a
120 h	21.3 \pm 1.52 ^c	22.1 \pm 0.56 ^b	20.6 \pm 1.65 ^{bc}	20.4 \pm 3.51 ^{ab}	15.3 \pm 1.90 ^a
144 h	16.2 \pm 1.94 ^{ab}	16.9 \pm 1.20 ^b	18.3 \pm 1.11 ^b	11.9 \pm 1.03 ^{ab}	10.9 \pm 0.20 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,01$) según Tukey

Las muestras refrigeradas con T0 disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) su Velocidad rectilínea (VSL) a partir de las 48 h de almacenamiento; mientras que las muestras suplementadas con ME (T1-T4) disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) la VSL a partir de 24 h de refrigeración (Figura 5, Tabla 16 y 17).

En relacion del CV del 43,54% para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de analisis y temperatura.

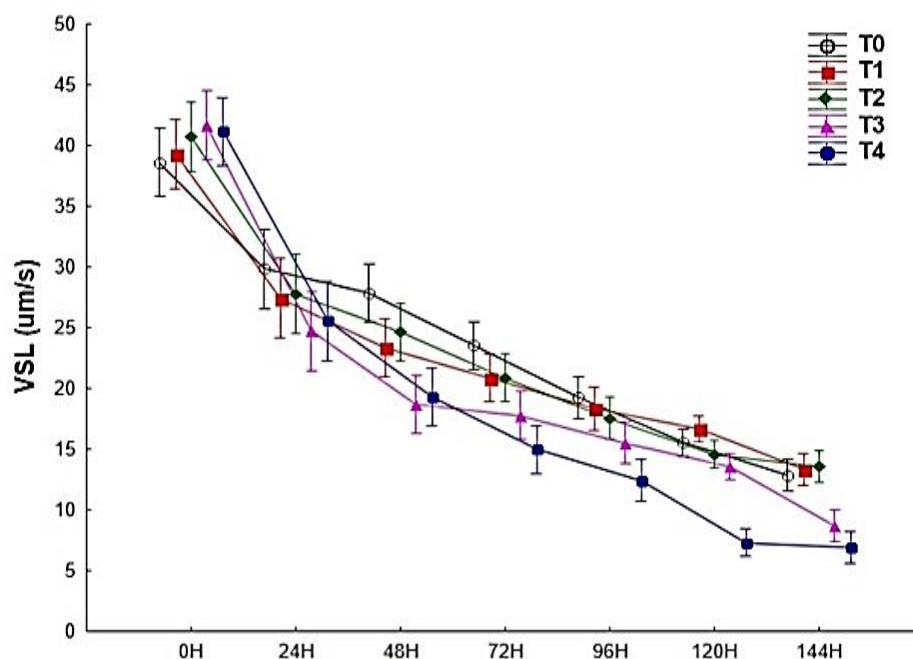


Figura 5. Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) de muestras espermáticas porcinas ($n=175$) diluidas con 0 (T0), 1 (T1), 10 (T2), 50 (T3) y 100 μM (T4) de melatonina y refrigerado durante 144 horas. CV= 43,54%.

Tabla 16. Porcentaje Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV= 43.54 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	38.6 \pm 1.97 ^a	39.3 \pm 2.57 ^a	40.7 \pm 4.11 ^{ab}	41.6 \pm 2.21 ^b	41.1 \pm 2.78 ^b
24 h	29.8 \pm 1.11 ^b	27.4 \pm 3.29 ^b	27.7 \pm 2.68 ^b	24.7 \pm 5.43 ^{ab}	25.5 \pm 2.36 ^a
48 h	27.8 \pm 1.94 ^b	23.3 \pm 2.13 ^{ab}	24.6 \pm 3.34 ^{ab}	18.6 \pm 2.57 ^a	19.3 \pm 1.68 ^a
72 h	23.5 \pm 2.21 ^c	20.8 \pm 1.63 ^{bc}	20.8 \pm 1.92 ^{bc}	17.8 \pm 2.27 ^{ab}	14.9 \pm 1.70 ^a
96 h	19.2 \pm 2.33 ^b	18.3 \pm 0.94 ^b	17.5 \pm 1.95 ^b	15.5 \pm 1.39 ^{ab}	12.4 \pm 1.83 ^a
120 h	15.5 \pm 1.10 ^b	16.6 \pm 0.76 ^b	14.5 \pm 1.21 ^b	13.5 \pm 1.48 ^b	7.3 \pm 0.94 ^a
144 h	12.8 \pm 1.83 ^{bc}	13.3 \pm 1.27 ^c	13.5 \pm 1.30 ^c	8.6 \pm 1.23 ^{ab}	6.9 \pm 0.53 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a,b,c,d), representan diferencias estadísticas ($P<0,05$) según Tukey

Tabla 17. Porcentaje Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV= 43.54 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	38.6 \pm 1.97 ^a	39.3 \pm 2.57 ^a	40.7 \pm 4.11 ^{ab}	41.6 \pm 2.21 ^b	41.1 \pm 2.78 ^b
24 h	29.8 \pm 1.11 ^b	27.4 \pm 3.29 ^b	27.7 \pm 2.68 ^b	24.7 \pm 5.43 ^{ab}	25.5 \pm 2.36 ^a
48 h	27.8 \pm 1.94 ^b	23.3 \pm 2.13 ^{ab}	24.6 \pm 3.34 ^{ab}	18.6 \pm 2.57 ^a	19.3 \pm 1.68 ^a
72 h	23.5 \pm 2.21 ^c	20.8 \pm 1.63 ^b	20.8 \pm 1.92 ^{ab}	17.8 \pm 2.27 ^{ab}	14.9 \pm 1.70 ^a
96 h	19.2 \pm 2.33 ^b	18.3 \pm 0.94 ^b	17.5 \pm 1.95 ^{ab}	15.5 \pm 1.39 ^b	12.4 \pm 1.83 ^a
120 h	15.5 \pm 1.10 ^b	16.6 \pm 0.76 ^b	14.5 \pm 1.21 ^b	13.5 \pm 1.48 ^b	7.3 \pm 0.94 ^a
144 h	12.8 \pm 1.83 ^b	13.3 \pm 1.27 ^b	13.5 \pm 1.30 ^b	8.6 \pm 1.23 ^{ab}	6.9 \pm 0.53 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a,b,c,d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,01$) según Tukey

Al analizar la Velocidad y Progresividad (Figura 6, Tabla 18 y 19) se evidenció diferencia significativa ($P < 0,05$) en el factor ‘*tiempo*’. Se presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos T0 y T4 a las 24 h. Asimismo, todos los tratamientos disminuyeron ($P < 0,05$) su Velocidad y Progresividad según incrementó el tiempo de refrigeración. Las muestras refrigeradas con T0 disminuyeron su Velocidad y Progresividad a partir de las 48 h de almacenamiento; mientras que las muestras T1-T2-T3-T4 disminuyeron su Velocidad y Progresividad a las 24h.

En relación del CV del 28.62 % para este tipo de investigación está un poco alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis, temperatura y almacenamiento.

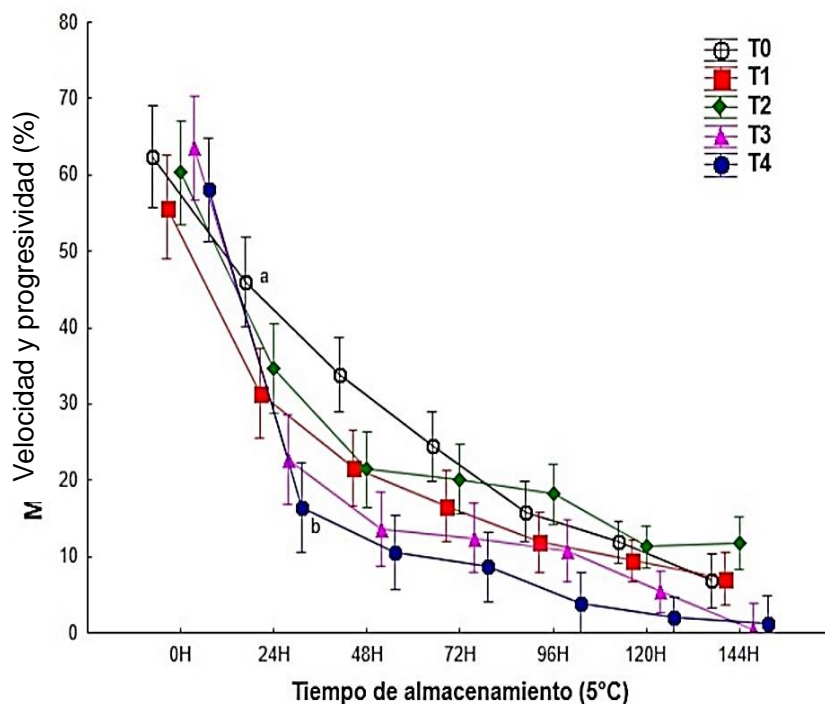


Figura 6. Velocidad y Progresividad (%): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 28,62%.

Tabla 18. Velocidad y Progresión (%): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 28.62 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	62.4 \pm 3.07 ^b	55.7 \pm 7.19 ^{ab}	60.2 \pm 9.30 ^b	63.5 \pm 4.99 ^{ab}	58.0 \pm 7.41 ^a
24 h	45.9 \pm 4.68 ^b	31.4 \pm 7.26 ^{ab}	34.5 \pm 6.31 ^b	22.6 \pm 6.87 ^{ab}	16.3 \pm 3.16 ^a
48 h	33.8 \pm 5.47 ^b	21.5 \pm 3.02 ^b	21.3 \pm 6.28 ^b	13.5 \pm 5.40 ^{ab}	10.5 \pm 3.39 ^a
72 h	24.4 \pm 5.95 ^b	16.63b \pm 2.48 ^b	20.1 \pm 5.97 ^{ab}	12.4 \pm 4.22 ^{ab}	8.6 \pm 3.21 ^a
96 h	15.8 \pm 4.78 ^b	11.88ab \pm 2.39 ^{ab}	18.2 \pm 5.75 ^b	10.7 \pm 3.95 ^{ab}	3.9 \pm 1.19 ^a
120 h	11.8 \pm 3.47 ^c	9.45bc \pm 1.38 ^{bc}	11.2 \pm 4.34 ^{bc}	5.4 \pm 1.83 ^{ab}	2.0 \pm 0.95 ^a
144 h	6.8 \pm 3.04 ^{ac}	7.12c \pm 1.59 ^c	11.7 \pm 6.90 ^{bc}	0.4 \pm 0.22 ^{ab}	1.3 \pm 0.72 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 19. *Velocidad y Progresión (%)*: Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 28.62 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	62.4 \pm 3.07 ^b	55.7 \pm 7.19 ^{ab}	60.2 \pm 9.30 ^{ab}	63.5 \pm 4.99 ^{ab}	58.0 \pm 7.41 ^a
24 h	45.9 \pm 4.68 ^b	31.4 \pm 7.26 ^{ab}	34.5 \pm 6.31 ^{ab}	22.6 \pm 6.87 ^{ab}	16.3 \pm 3.16 ^a
48 h	33.8 \pm 5.47 ^b	21.5 \pm 3.02 ^b	21.3 \pm 6.28 ^{ab}	13.5 \pm 5.40 ^{ab}	10.5 \pm 3.39 ^a
72 h	24.4 \pm 5.95 ^b	16.63b \pm 2.48 ^b	20.1 \pm 5.97 ^{ab}	12.4 \pm 4.22 ^{ab}	8.6 \pm 3.21 ^a
96 h	15.8 \pm 4.78 ^b	11.88ab \pm 2.39 ^{ab}	18.2 \pm 5.75 ^b	10.7 \pm 3.95 ^{ab}	3.9 \pm 1.19 ^a
120 h	11.8 \pm 3.47 ^b	9.45bc \pm 1.38 ^{ab}	11.2 \pm 4.34 ^b	5.4 \pm 1.83 ^{ab}	2.0 \pm 0.95 ^a
144 h	6.8 \pm 3.04 ^{ab}	7.12c \pm 1.59 ^b	11.7 \pm 6.90 ^{ab}	0.4 \pm 0.22 ^{ab}	1.3 \pm 0.72 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

4.3 Evaluación de los parámetros de relación de progresión

En el análisis del índice de Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) se observaron diferencias significativas (P<0,05) en el factor ‘*tiempo*’, y la interacción entre ‘*tiempo x tratamiento*’. No se presentaron diferencias significativas (P>0,05) de STR y LIN entre tratamientos en cada unidad de tiempo analizado. Sin embargo, se determinó todos los tratamientos disminuyeron (P<0,05) la STR, LIN y WOB según incrementó el tiempo de refrigeración.

Las muestras refrigeradas con T0 disminuyeron (P<0,05) el Inicie de rectitud % (STR) a partir de las 72 h de almacenamiento; las muestras de T1-T2, disminuyeron la STR a las 48 h y los Tratamiento T3-T4 disminuyeron a las 24 h (Figura 7, Tabla 18 y 19).

En relacion del CV del 30.06 % para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de analisis.

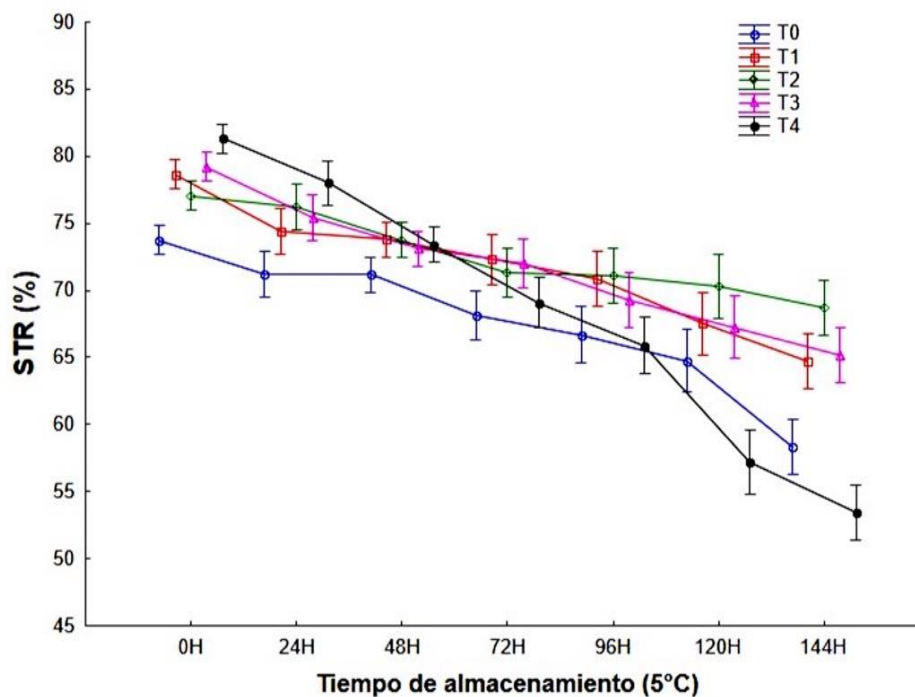


Figura 7. Índice de rectitud % (STR) en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 30,06%.

Tabla 18. Índice de rectitud % (STR): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 30.06 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	73.7 \pm 0.52 ^a	78.6 \pm 1.21 ^b	77.0 \pm 0.96 ^{ab}	79.1 \pm 1.05 ^b	81.3 \pm 1.44 ^b
24 h	71.2 \pm 0.44 ^a	74.3 \pm 1.06 ^b	76.2 \pm 2.97 ^{ab}	75.3 \pm 1.14 ^b	77.9 \pm 1.73 ^{ab}
48 h	71.1 \pm 0.48 ^a	73.7 \pm 0.61 ^b	73.7 \pm 1.72 ^b	73.0 \pm 1.55 ^b	73.4 \pm 1.60 ^b
72 h	68.1 \pm 0.84 ^a	72.3 \pm 1.56 ^b	71.3 \pm 2.44 ^b	72.0 \pm 1.57 ^b	69.0 \pm 2.33 ^{ab}
96 h	66.7 \pm 1.12 ^a	70.8 \pm 1.63 ^b	71.1 \pm 1.50 ^b	69.2 \pm 0.66 ^b	65.8 \pm 3.87 ^a
120 h	64.7 \pm 1.14 ^{ab}	67.5 \pm 1.59 ^b	70.2 \pm 2.56 ^b	67.2 \pm 1.57 ^b	57.1 \pm 3.88 ^a
144 h	58.3 \pm 1.11 ^{ab}	64.7 \pm 2.25 ^{bc}	68.7 \pm 1.84 ^c	65.2 \pm 2.22 ^{bc}	53.4 \pm 2.55 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 19. Índice de rectitud % (STR): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 30.06 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	73.7 \pm 0.52 ^a	78.6 \pm 1.21 ^b	77.0 \pm 0.96 ^{ab}	79.1 \pm 1.05 ^b	81.3 \pm 1.44 ^b
24 h	71.2 \pm 0.44 ^a	74.3 \pm 1.06 ^b	76.2 \pm 2.97 ^{ab}	75.3 \pm 1.14 ^b	77.9 \pm 1.73 ^{ab}
48 h	71.1 \pm 0.48 ^a	73.7 \pm 0.61 ^b	73.7 \pm 1.72 ^b	73.0 \pm 1.55 ^b	73.4 \pm 1.60 ^b
72 h	68.1 \pm 0.84 ^a	72.3 \pm 1.56 ^b	71.3 \pm 2.44 ^b	72.0 \pm 1.57 ^b	69.0 \pm 2.33 ^{ab}
96 h	66.7 \pm 1.12 ^a	70.8 \pm 1.63 ^b	71.1 \pm 1.50 ^b	69.2 \pm 0.66 ^b	65.8 \pm 3.87 ^a
120 h	64.7 \pm 1.14 ^{ab}	67.5 \pm 1.59 ^b	70.2 \pm 2.56 ^b	67.2 \pm 1.57 ^b	57.1 \pm 3.88 ^a
144 h	58.3 \pm 1.11 ^{ab}	64.7 \pm 2.25 ^{bc}	68.7 \pm 1.84 ^c	65.2 \pm 2.22 ^{bc}	53.4 \pm 2.55 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

Todos los tratamientos disminuyeron (P<0,05) el Porcentaje de Linealidad (LIN) según incrementó el tiempo de refrigeración.

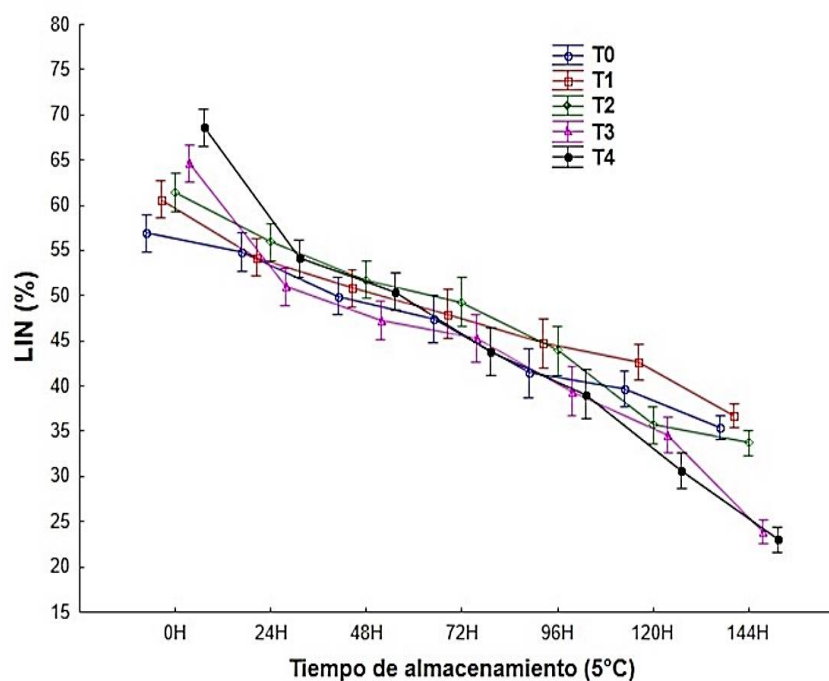


Figura 8. Porcentaje de Linealidad (LIN) en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 29,47%.

Las muestras refrigeradas con T2 disminuyeron su LIN a partir de las 144 h de almacenamiento; la muestra T0 y T1 disminuyeron la LIN a las 120 h, el T3 disminuyeron a las 96 h y el Tratamiento T4 disminuyo a las 72 h. (Figura 8, Tabla 20 y 21). Podemos decir que tan solo el Tratamiento T2, supero al Control en este parámetro de Linealidad.

En relacion del CV del 29.47 % para este tipo de investigación esta un poco alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de analisis.

Tabla 20. *Porcentaje de Linealidad (LIN): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 29.47 %.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	56.9 \pm 2.25 ^a	60.6 \pm 2.80 ^{ab}	61.4 \pm 2.23 ^{abc}	64.6 \pm 0.84 ^{bc}	68.6 \pm 1.64 ^c
24 h	54.8 \pm 1.08 ^{ab}	54.2 \pm 2.31 ^{ab}	55.9 \pm 2.76 ^b	50.9 \pm 2.21 ^a	54.1 \pm 1.77 ^{ab}
48 h	49.9 \pm 2.12 ^{ab}	50.8 \pm 1.28 ^{ab}	51.7 \pm 1.77 ^b	47.2 \pm 2.86 ^a	50.4 \pm 2.02 ^{ab}
72 h	47.4 \pm 2.07 ^{ab}	47.9 \pm 1.74 ^{ab}	49.2 \pm 3.07 ^b	45.2 \pm 2.43 ^{ab}	43.8 \pm 3.59 ^a
96 h	41.4 \pm 2.19 ^{ab}	44.7 \pm 1.10 ^b	43.9 \pm 2.69 ^b	39.3 \pm 1.70 ^{ab}	39.0 \pm 4.55 ^a
120 h	39.6 \pm 0.88 ^{bc}	42.6 \pm 0.33 ^c	35.6 \pm 2.60 ^{abc}	34.5 \pm 1.05 ^{ab}	30.6 \pm 3.36 ^a
144 h	35.4 \pm 1.50 ^b	36.7 \pm 1.50 ^b	33.7 \pm 0.84 ^b	23.9 \pm 1.30 ^a	23.0 \pm 1.52 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 21. *Porcentaje de Linealidad (LIN): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 29.47 %.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	56.9 \pm 2.25 ^a	60.6 \pm 2.80 ^{ab}	61.4 \pm 2.23 ^{ab}	64.6 \pm 0.84 ^{ab}	68.6 \pm 1.64 ^b
24 h	54.8 \pm 1.08 ^{ab}	54.2 \pm 2.31 ^{ab}	55.9 \pm 2.76 ^b	50.9 \pm 2.21 ^a	54.1 \pm 1.77 ^{ab}
48 h	49.9 \pm 2.12 ^{ab}	50.8 \pm 1.28 ^{ab}	51.7 \pm 1.77 ^b	47.2 \pm 2.86 ^a	50.4 \pm 2.02 ^{ab}
72 h	47.4 \pm 2.07 ^{ab}	47.9 \pm 1.74 ^{ab}	49.2 \pm 3.07 ^b	45.2 \pm 2.43 ^{ab}	43.8 \pm 3.59 ^a
96 h	41.4 \pm 2.19 ^{ab}	44.7 \pm 1.10 ^b	43.9 \pm 2.69 ^b	39.3 \pm 1.70 ^{ab}	39.0 \pm 4.55 ^a
120 h	39.6 \pm 0.88 ^{ab}	42.6 \pm 0.33 ^b	35.6 \pm 2.60 ^{ab}	34.5 \pm 1.05 ^{ab}	30.6 \pm 3.36 ^a
144 h	35.4 \pm 1.50 ^b	36.7 \pm 1.50 ^b	33.7 \pm 0.84 ^b	23.9 \pm 1.30 ^a	23.0 \pm 1.52 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

Se presentó diferencias significativas (P<0,05) en Porcentaje de Oscilación (WOB) entre el T0 y T4 a las 144 h de refrigeración. Asimismo, las muestras refrigeradas con T4 y T0 disminuyeron su WOB a partir de las 96 h y 72 h de almacenamiento respectivamente; mientras que la muestra T1 y T2 disminuyeron su WOB a las 48 h (Figura 9, Tabla 22 y 23).

En relación del CV del 22.22 % para este tipo de investigación está un poco alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis.

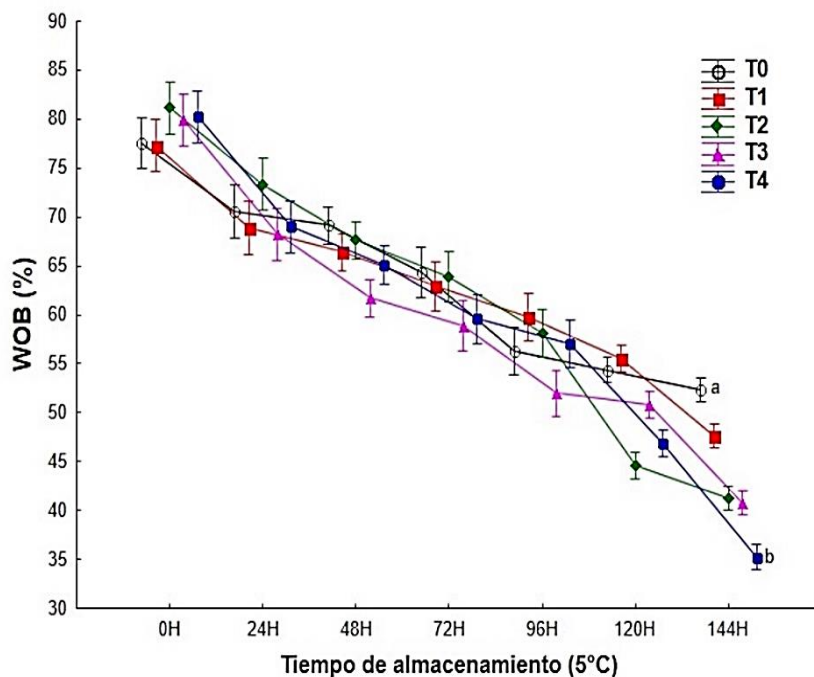


Figura 9. Porcentaje de Oscilación (WOB) en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 22,22%.

Tabla 22. Porcentaje de Oscilación (WOB): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 22.22 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	77.5 \pm 2.91 ^a	77.3 \pm 3.16 ^a	81.1 \pm 2.72 ^b	79.9 \pm 1.96 ^{ab}	80.2 \pm 2.29 ^b
24 h	70.5 \pm 2.80 ^a	68.9 \pm 2.31 ^a	73.3 \pm 2.73 ^b	68.2 \pm 3.84 ^{ab}	68.9 \pm 1.01 ^b
48 h	69.1 \pm 1.74 ^b	66.4 \pm 1.67 ^{ab}	67.6 \pm 1.66 ^{ab}	61.7 \pm 2.32 ^a	65.1 \pm 2.04 ^{ab}
72 h	64.3 \pm 2.31 ^b	62.9 \pm 1.36 ^{ab}	63.8 \pm 3.19 ^{ab}	58.8 \pm 2.31 ^a	59.5 \pm 3.14 ^{ab}
96 h	56.3 \pm 1.86 ^b	59.7 \pm 1.51 ^b	58.0 \pm 3.19 ^{ab}	51.9 \pm 1.94 ^a	57.0 \pm 3.09 ^{ab}
120 h	54.3 \pm 0.71 ^b	55.5 \pm 1.40 ^b	44.6 \pm 0.31 ^a	50.7 \pm 1.64 ^{ab}	46.8 \pm 1.98 ^a
144 h	52.3 \pm 1.05 ^c	47.6 \pm 1.89 ^c	41.2 \pm 0.46 ^b	40.8 \pm 1.40 ^{ab}	35.2 \pm 1.03 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 23. *Porcentaje de Oscilación (WOB): Media ± EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 22.22 %.*

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	77.5 ± 2.91 ^a	77.3 ± 3.16 ^a	81.1 ± 2.72 ^b	79.9 ± 1.96 ^{ab}	80.2 ± 2.29 ^b
24 h	70.5 ± 2.80 ^a	68.9 ± 2.31 ^a	73.3 ± 2.73 ^b	68.2 ± 3.84 ^{ab}	68.9 ± 1.01 ^b
48 h	69.1 ± 1.74 ^b	66.4 ± 1.67 ^{ab}	67.6 ± 1.66 ^{ab}	61.7 ± 2.32 ^a	65.1 ± 2.04 ^{ab}
72 h	64.3 ± 2.31 ^b	62.9 ± 1.36 ^{ab}	63.8 ± 3.19 ^{ab}	58.8 ± 2.31 ^a	59.5 ± 3.14 ^{ab}
96 h	56.3 ± 1.86 ^b	59.7 ± 1.51 ^b	58.0 ± 3.19 ^{ab}	51.9 ± 1.94 ^a	57.0 ± 3.09 ^{ab}
120 h	54.3 ± 0.71 ^{bc}	55.5 ± 1.40 ^c	44.6 ± 0.31 ^a	50.7 ± 1.64 ^{abc}	46.8 ± 1.98 ^{ab}
144 h	52.3 ± 1.05 ^c	47.6 ± 1.89 ^c	41.2 ± 0.46 ^{ab}	40.8 ± 1.40 ^{ab}	35.2 ± 1.03 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

4.4 Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.

Al observar la ALH se evidenció diferencias significativas (P<0,05) en el factor ‘tiempo’. No se presentaron diferencias significativas (P>0,05) entre tratamientos en cada unidad de tiempo analizado. Al analizar el factor tiempo, todos los tratamientos disminuyeron (P<0,05) su ALH según incrementó el tiempo de refrigeración. Las muestras refrigeradas con T2 disminuyeron su ALH a partir de las 96 h de almacenamiento; la muestra T0 disminuyó la ALH a partir de las 72 h; el T1, T3 y T4 disminuyó a las 48 h. (Figura 10, Tabla 24 y 25).

En relación del CV del 36% para este tipo de investigación esta alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis y almacenamiento.

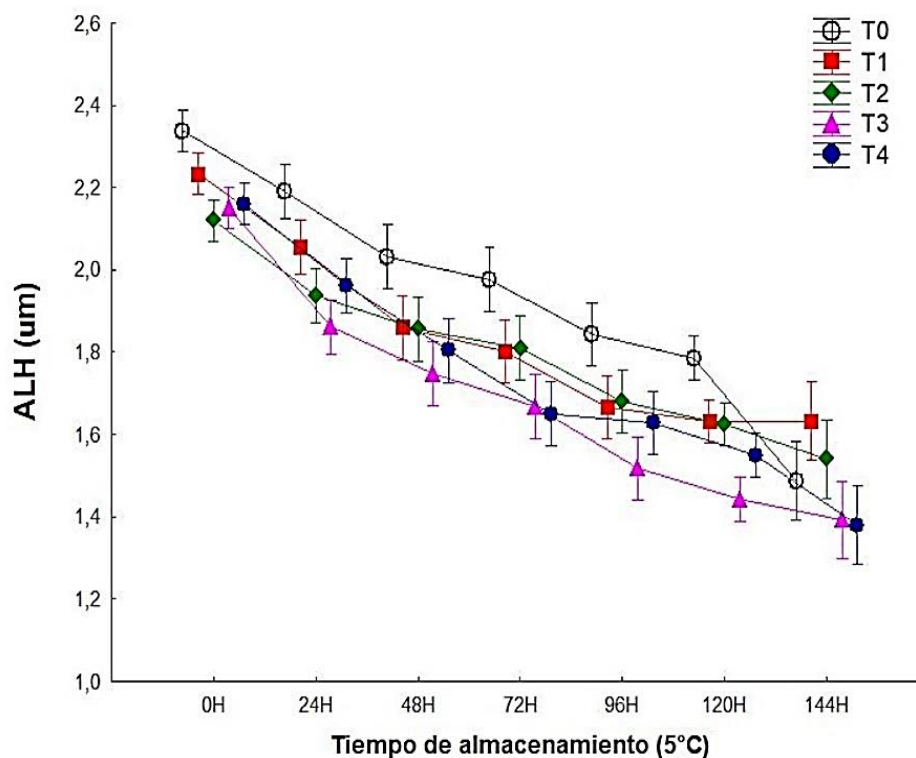


Figura 10. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza μm (ALH): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. ($n = 175$). CV= 36%.

Tabla 24. Porcentaje de Amplitud del movimiento lateral de la cabeza μm (ALH): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV= 36.00 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	2.3 \pm 0.04 ^b	2.2 \pm 0.04 ^{ab}	2.1 \pm 0.09 ^a	2.1 \pm 0.03 ^{ab}	2.1 \pm 0.01 ^{ab}
24 h	2.1 \pm 0.04 ^b	2.0 \pm 0.11 ^{ab}	1.9 \pm 0.06 ^{ab}	1.8 \pm 0.04 ^a	1.9 \pm 0.06 ^{ab}
48 h	2.0 \pm 0.05 ^b	1.8 \pm 0.10 ^{ab}	1.8 \pm 0.11 ^{ab}	1.7 \pm 0.07 ^a	1.8 \pm 0.04 ^{ab}
72 h	1.9 \pm 0.08 ^b	1.8 \pm 0.07 ^{ab}	1.8 \pm 0.08 ^{ab}	1.6 \pm 0.08 ^a	1.6 \pm 0.07 ^a
96 h	1.8 \pm 0.10 ^b	1.6 \pm 0.09 ^{ab}	1.6 \pm 0.03 ^{ab}	1.5 \pm 0.08 ^a	1.6 \pm 0.06 ^{ab}
120 h	1.7 \pm 0.07 ^b	1.6 \pm 0.04 ^{ab}	1.6 \pm 0.04 ^{ab}	1.4 \pm 0.07 ^a	1.5 \pm 0.04 ^a
144 h	1.4 \pm 0.15 ^{ab}	1.6 \pm 0.02 ^b	1.5 \pm 0.08 ^{ab}	1.3 \pm 0.12 ^a	1.3 \pm 0.01 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,05$) según Tukey

Tabla 25. Porcentaje de Amplitud del movimiento lateral de la cabeza μm (ALH): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. ($n = 175$). CV= 36.00 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	2.3 \pm 0.04 ^b	2.2 0.04 ^{ab}	2.1 \pm 0.09 ^a	2.1 \pm 0.03 ^{ab}	2.1 \pm 0.01 ^{ab}
24 h	2.1 \pm 0.04 ^b	2.0 \pm 0.11 ^{ab}	1.9 \pm 0.06 ^{ab}	1.8 \pm 0.04 ^a	1.9 \pm 0.06 ^{ab}
48 h	2.0 \pm 0.05 ^b	1.8 \pm 0.10 ^{ab}	1.8 \pm 0.11 ^{ab}	1.7 \pm 0.07 ^a	1.8 \pm 0.04 ^{ab}
72 h	1.9 \pm 0.08 ^b	1.8 \pm 0.07 ^{ab}	1.8 \pm 0.08 ^{ab}	1.6 \pm 0.08 ^a	1.6 \pm 0.07 ^a
96 h	1.8 \pm 0.10 ^b	1.6 \pm 0.09 ^{ab}	1.6 \pm 0.03 ^{ab}	1.5 \pm 0.08 ^a	1.6 \pm 0.06 ^{ab}
120 h	1.7 \pm 0.07 ^b	1.6 \pm 0.04 ^{ab}	1.6 \pm 0.04 ^{ab}	1.4 \pm 0.07 ^a	1.5 \pm 0.04 ^{ab}
144 h	1.4 \pm 0.15 ^{ab}	1.6 \pm 0.02 ^b	1.5 \pm 0.08 ^{ab}	1.3 \pm 0.12 ^a	1.3 \pm 0.01 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,01$) según Tukey

4.5 Frecuencia de batida de flagelo.

La Frecuencia de cruce Hz BCF (Figura 11, Tabla 26 y 27) presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) en el factor 'tiempo' y la interacción '*tiempo-tratamiento*'. Se registró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos T0 y T4 a las 120 h, y entre los tratamientos T3 y T4 a las 144 h.

En relacion del CV del 25.61 % para este tipo de investigación esta un poco alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de analisis y almacenamiento.

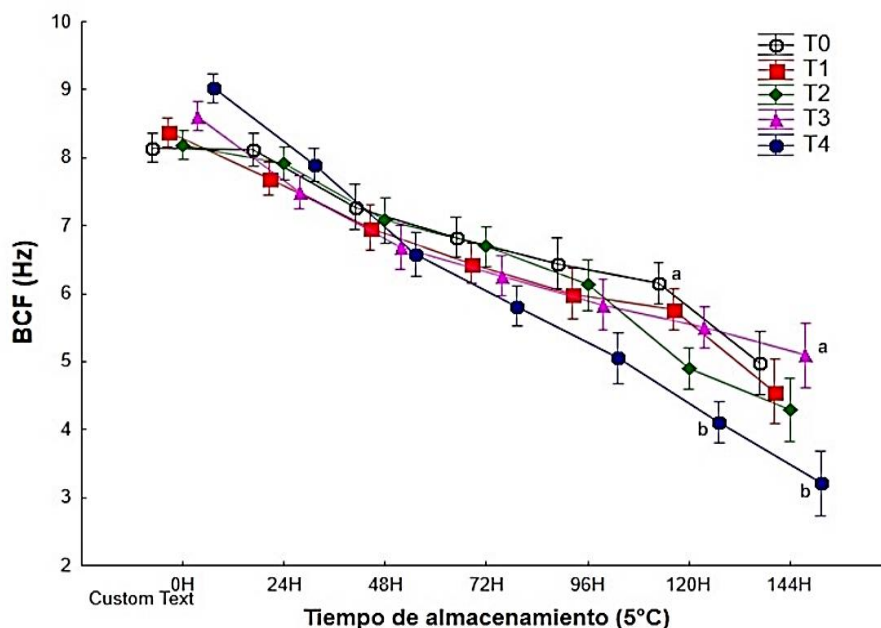


Figura 11. Frecuencia de cruce Hz (BCF): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 25,61%.

Al analizar el factor tiempo, todos los tratamientos disminuyeron ($P < 0,05$) su BCF según incrementó el tiempo de refrigeración. Las muestras refrigeradas con T0 y T2 disminuyeron su BCF a partir de las 96 h de almacenamiento; la muestra T1 disminuyeron la BCF a las 72 h, el T3-T4 disminuyeron a las 48 h.

Tabla 26. Porcentaje de Frecuencia de cruce Hz (BCF): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 25.61 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	8.1 \pm 0.20 ^a	8.3 \pm 0.15 ^{ab}	8.1 \pm 0.21 ^{ab}	8.6 \pm 0.20 ^b	9.0 \pm 0.28 ^b
24 h	8.1 \pm 0.33 ^b	7.6 \pm 0.22 ^a	7.9 \pm 0.06 ^{ab}	7.4 \pm 0.30 ^a	7.8 \pm 0.22 ^b
48 h	7.2 \pm 0.44 ^b	6.9 \pm 0.37 ^a	7.0 \pm 0.30 ^a	6.6 \pm 0.14 ^{ab}	6.5 \pm 0.34 ^a
72 h	6.8 \pm 0.41 ^b	6.4 \pm 0.22 ^{ab}	6.6 \pm 0.39 ^{ab}	6.2 \pm 0.15 ^{ab}	5.8 \pm 0.22 ^a
96 h	6.4 \pm 0.35 ^b	5.9 \pm 0.21 ^{ab}	6.1 \pm 0.44 ^b	5.8 \pm 0.30 ^{ab}	5.0 \pm 0.50 ^a
120 h	6.1 \pm 0.24 ^b	5.7 \pm 0.20 ^b	4.9 \pm 0.21 ^{ab}	5.5 \pm 0.35 ^b	4.1 \pm 0.45 ^a
144 h	4.9 \pm 0.62 ^b	4.5 \pm 0.11 ^b	4.3 \pm 0.06 ^{ab}	5.0 \pm 0.63 ^b	3.2 \pm 0.55 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas ($P < 0,05$) según Tukey

Tabla 27. Porcentaje de Frecuencia de cruce Hz (BCF): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 25.61 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	8.1 \pm 0.20 ^a	8.3 \pm 0.15 ^{ab}	8.1 \pm 0.21 ^{ab}	8.6 \pm 0.20 ^b	9.0 \pm 0.28 ^b
24 h	8.1 \pm 0.33 ^b	7.6 \pm 0.22 ^a	7.9 \pm 0.06 ^{ab}	7.4 \pm 0.30 ^a	7.8 \pm 0.22 ^b
48 h	7.2 \pm 0.44 ^b	6.9 \pm 0.37 ^a	7.0 \pm 0.30 ^a	6.6 \pm 0.14 ^{ab}	6.5 \pm 0.34 ^a
72 h	6.8 \pm 0.41 ^b	6.4 \pm 0.22 ^{ab}	6.6 \pm 0.39 ^{ab}	6.2 \pm 0.15 ^{ab}	5.8 \pm 0.22 ^a
96 h	6.4 \pm 0.35 ^b	5.9 \pm 0.21 ^{ab}	6.1 \pm 0.44 ^{ab}	5.8 \pm 0.30 ^{ab}	5.0 \pm 0.50 ^a
120 h	6.1 \pm 0.24 ^b	5.7 \pm 0.20 ^b	4.9 \pm 0.21 ^{ab}	5.5 \pm 0.35 ^{ab}	4.1 \pm 0.45 ^a
144 h	4.9 \pm 0.62 ^b	4.5 \pm 0.11 ^b	4.3 \pm 0.06 ^{ab}	5.0 \pm 0.63 ^b	3.2 \pm 0.55 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

4.6 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

Al analizar la Integridad de la Membrana Plasmática (Vitalidad), se evidenció diferencias significativas (P<0,05) en el factor tiempo. No se presentaron diferencias significativas (P>0,05) entre tratamientos en cada unidad de tiempo analizado, (Figura 12). Al analizar el factor tiempo, todos los tratamientos disminuyeron (P<0,05) su Vitalidad según incrementó el tiempo de refrigeración. Las muestras refrigeradas con T0-T1-T2-T3 disminuyeron su Vitalidad a partir de las 48 h de almacenamiento; la muestra T4 disminuyó su Vitalidad a las 24h. (Figura 12, Tabla 28 y 29).

En relación del CV del 54.38 % para este tipo de investigación está un poco alto, debido a la variabilidad en el registro de los datos debido en las diferentes horas de análisis.

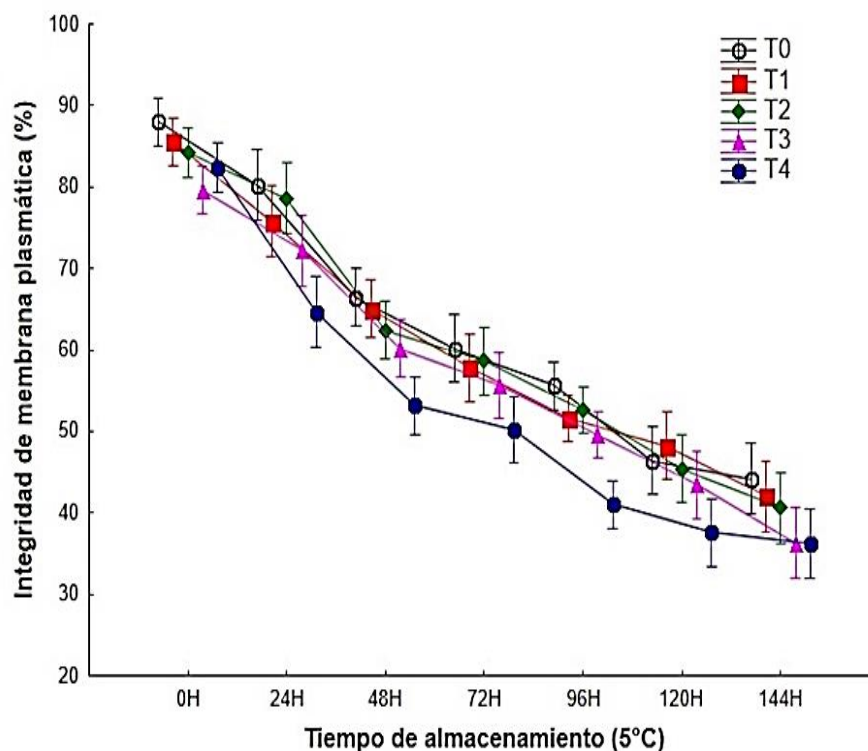


Figura 12. Integridad de la Membrana Plasmática Vitalidad (%): Medias en cinco tratamientos con adición de melatonina en dosis crecientes, evaluados entre 0h y 144h cada 24 horas. (n = 175). CV= 54,38%.

Tabla 28. Integridad de la Membrana Plasmática Vitalidad (%): Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 54.38 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	88.0 \pm 2.00 ^b	85.6 \pm 2.73 ^{ab}	84.2 \pm 1.93 ^{ab}	79.6 \pm 4.62 ^a	82.4 \pm 2.68 ^{ab}
24 h	80.2 \pm 2.08 ^b	75.8 \pm 3.54 ^{ab}	78.6 \pm 1.81 ^{ab}	72.2 \pm 3.26 ^a	64.6 \pm 7.98 ^{ab}
48 h	66.4 \pm 2.77 ^b	65.0 \pm 3.05 ^{ab}	62.4 \pm 2.48 ^{ab}	60.2 \pm 3.09 ^{ab}	53.2 \pm 5.47 ^a
72 h	60.2 \pm 3.56 ^b	57.8 \pm 3.65 ^b	58.6 \pm 3.50 ^b	55.6 \pm 2.77 ^b	50.2 \pm 6.16 ^a
96 h	55.6 \pm 2.25 ^b	51.6 \pm 2.01 ^b	52.6 \pm 1.96 ^b	49.6 \pm 3.25 ^b	41.0 \pm 4.27 ^a
120 h	46.4 \pm 4.23 ^{ab}	48.2 \pm 3.97 ^b	45.4 \pm 3.75 ^{ab}	43.4 \pm 4.24 ^{ab}	37.6 \pm 4.45 ^a
144 h	44.2 \pm 3.77 ^b	42.0 \pm 4.09 ^b	40.6 \pm 3.19 ^{ab}	36.2 \pm 4.82 ^a	36.2 \pm 5.36 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,05) según Tukey

Tabla 29. *Integridad de la Membrana Plasmática Vitalidad (%)*: Media \pm EEM de los diferentes tratamientos con dosis crecientes de Melatonina, y su comportamiento en un rango de 0 - 144 horas post dilución, cada 24 h. (n = 175). CV= 54.38 %.

TIEMPO EN HORAS	Tratamientos*				
	T0	T1	T2	T3	T4
	Media	Media	Media	Media	Media
0 h	88.0 \pm 2.00 ^b	85.6 \pm 2.73 ^{ab}	84.2 \pm 1.93 ^{ab}	79.6 \pm 4.62 ^a	82.4 \pm 2.68 ^{ab}
24 h	80.2 \pm 2.08 ^b	75.8 \pm 3.54 ^{ab}	78.6 \pm 1.81 ^{ab}	72.2 \pm 3.26 ^a	64.6 \pm 7.98 ^{ab}
48 h	66.4 \pm 2.77 ^b	65.0 \pm 3.05 ^{ab}	62.4 \pm 2.48 ^{ab}	60.2 \pm 3.09 ^{ab}	53.2 \pm 5.47 ^a
72 h	60.2 \pm 3.56 ^b	57.8 \pm 3.65 ^b	58.6 \pm 3.50 ^b	55.6 \pm 2.77 ^b	50.2 \pm 6.16 ^a
96 h	55.6 \pm 2.25 ^b	51.6 \pm 2.01 ^{ab}	52.6 \pm 1.96 ^{ab}	49.6 \pm 3.25 ^{ab}	41.0 \pm 4.27 ^a
120 h	46.4 \pm 4.23 ^{ab}	48.2 \pm 3.97 ^b	45.4 \pm 3.75 ^{ab}	43.4 \pm 4.24 ^{ab}	37.6 \pm 4.45 ^a
144 h	44.2 \pm 3.77 ^b	42.0 \pm 4.09 ^b	40.6 \pm 3.19 ^{ab}	36.2 \pm 4.82 ^a	36.2 \pm 5.36 ^a

* Diferentes superíndices en cada fila (a, b, c, d), representan diferencias estadísticas (P<0,01) según Tukey

4.7 Objetivo específico dos: determinación del costo beneficio en la adición del conservante (melatonina) en diferentes concentraciones.

El costo Beneficio en la utilización del antioxidante Melatonina fue basado en el costo de Producción del Tratamiento Control (T0) más la adición de Me en dosis crecientes en diferentes tratamientos: CONTROL, T1 (1 μ M), T2 (10 μ M), T3 (50 μ M) y T4 (100 μ M) (Tabla 9).

Tabla 30. Costo de producción del Tratamiento control (T0) (dólares).

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	TOTAL
CAMPO				
Recolección de eyaculado (7,5 ml/250 ml)	ml	0,03	30	0,9000
Guantes para recolección de semen (50 pares)	U	0,1	4	0,4000
Tubos falcon (15 ml)	U	2	0,14	0,2800
Tubo de recolector de semen porcino	U	1	0,5	0,5000
Agua destilada tipo 1	litro	0,05	0,63	0,0315
NUTRIXcell ultra (50 g)	G	0,375	0,1958	0,0734
Caja térmica (\$ 30/365 días)	días	1	0,08	0,0800
Transporte campo laboratorio/recolección	U	1	3,5	3,5000
LABORATORIO				0,0000
Tubos falcon (15 ml)	U	10	0,14	1,4000
NUTRIXcell ultra (50 g). Para los 5 tratamientos	G	1,25	0,1958	0,2448
Tubos eppendorf	U	70	0,024	1,68
Botu special (1 litro)	ml	7	0,12	0,84
Puntas micro pipeta	U	280	0,00896	2,5088
Porta objetos	U	140	0,0949	13,286
Cubre objetos	U	140	0,0256	3,584
Mano de obra tesista (2h por día x 7 días)	H	14	2,5	35
T O T A L				64,31

En la Tabla 30, se detalla el costo de producción de cada uno de los tratamientos, donde presentan un incremento progresivo con el aumento de la dosis del antioxidante:

T0 CONTROL = \$64,31; T1 (1 μ M) = \$64,48; T2 (10 μ M) = \$66,05; T3 (50 μ M) = \$73,01 y T4 (100 μ M) = \$81,71.

Tabla 31. *Costo de producción con adición de MELATONINA (dólares).*

CONCEPTO	T0	T1	T2	T3	T4
	CONTROL	(1 μ M)	(10 μ M)	(50 μ M)	(100 μ M)
CAMPO					
Recolección de eyaculado (7,5 ml/250 ml)	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900
Guantes para recolección de semen	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
Tubos falcon (15 ml)	0,280	0,280	0,280	0,280	0,280
Tubo de recolector de semen porcino	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Agua destilada tipo 1	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032
NUTRIXcell ultra (50 g)	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073
Caja térmica (\$ 30/365 días)	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080
Transporte campo laboratorio/recolección	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500
LABORATORIO					
Tubos falcon (15 ml)	1,400	1,400	1,400	1,400	1,400
NUTRIXcell ultra (50 g). Para los 5 tratamientos	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245
Tubos eppendorf	1,680	1,680	1,680	1,680	1,680
Botu special (1 litro)	0,840	0,840	0,840	0,840	0,840
Puntas micro pipeta	2,509	2,509	2,509	2,509	2,509
Porta objetos	13,286	13,286	13,286	13,286	13,286
Cubre objetos	3,584	3,584	3,584	3,584	3,584
Mano de obra tesista (4h por día x 7 días)	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
<i>MELATONINA (antioxidante en dosis crecientes)</i>	0,000	0,174	1,740	8,699	17,398
T O T A L	64,31	64,48	66,05	73,01	81,71

En la Figura 13 podemos observar que la adición de Melatonina, incrementó el porcentaje del coste, en T1 = 0,27%, T2 = 2,71%, T3 = 13,53%, y T4 = 27,05%, frente al control, que para el análisis se lo tomó como 0,00%.

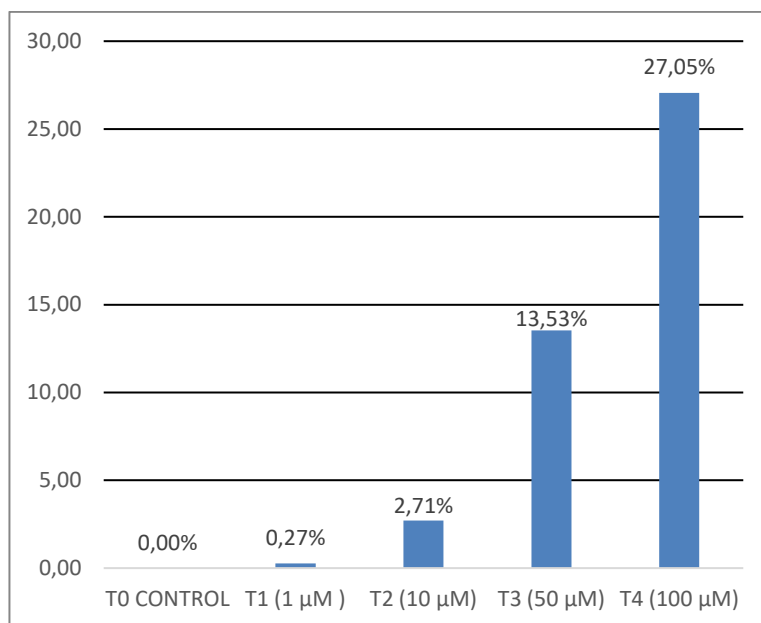


Figura 13. Incremento en porcentaje del costo por tratamiento, frente al control (T0).

De los resultados obtenidos en el Objetivo anterior “*Evaluar la viabilidad con la adición de NUTRIXcell Ultra más MELATONINA al 1; 10; 50 y 100 µM*”, podemos decir del comportamiento de las variables en estudio, el Tratamiento T1 y T2, mostraron ser más eficaces en la protección de los espermatozoides en ocho variables, con un incremento de tiempo de vida, post dilución de 60h y 69h promedio, respectivamente. Los tratamientos T3 y T4, presentaron tan solo un promedio de 42h y 36h.

En el análisis costo beneficio podemos observar que en T1 y T2 con un incremento en el costo (por el valor de la Melatonina) de (0,27% y 2,71%) respectivamente, se registró un tiempo de vida promedio de 60 y 69 horas, mientras que en los tratamientos T3 y T4 con porcentajes superiores en su costo (13,53 % y 27,05%), la respuesta antioxidante fue menor con (36h y 42h) respectivamente, o inversamente proporcional, (Figura 14).

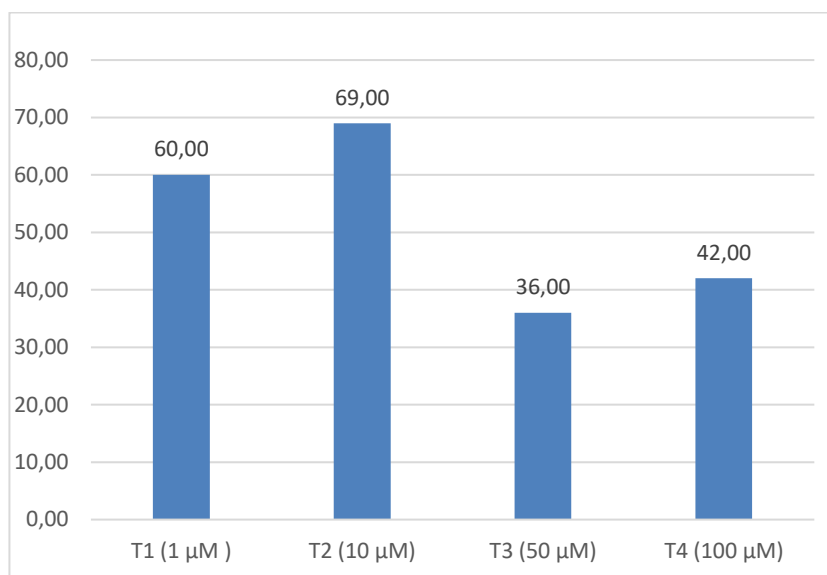


Figura 14. Incremento de tiempo (horas) de vida, post dilución con el antioxidante Melatonina, en dosis crecientes: (T1 (1 µM), T2 (10 µM), T3 (50 µM) y T4 (100 µM)).

Esto se evidenció estadísticamente en esta investigación cuando las muestras refrigeradas con T1 disminuyeron su MT a partir de las 72 h de almacenamiento; las muestras de T0 y T2, disminuyeron la MT a las 48 h, y las muestras de T3 y T4 a las 24 h (Tabla 10., Figura 2). Podemos decir que se observó mejor respuesta en el tiempo (72 h.) de la acción de la Melatonina (antioxidante) (T1=NUTRIXcell Ultra 100% + melatonina 1 µM + Semen), frente a los otros tratamientos (T3, T4), que, con mayores dosis de Melatonina, su MT, disminuyó en menor tiempo (24h y 48h).

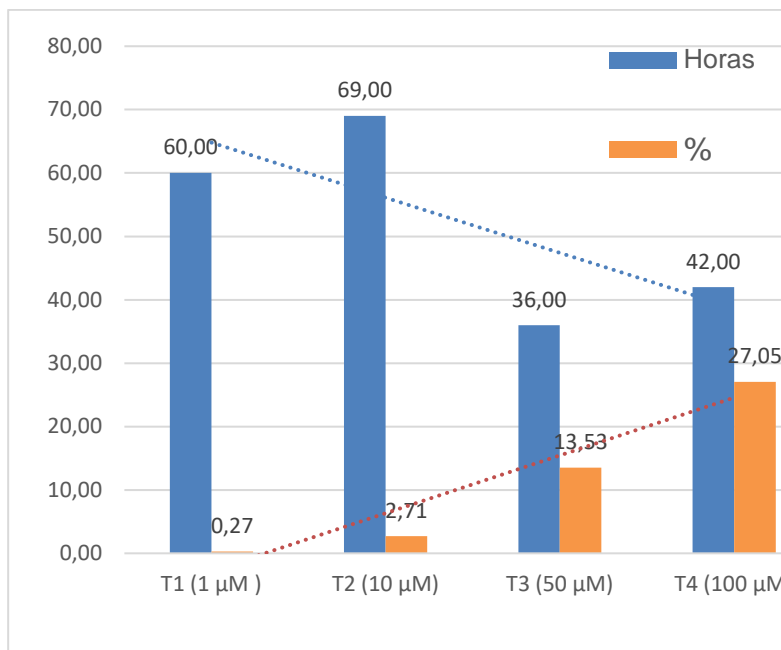


Figura 15. Relación Costo Beneficio, a más horas de Vida, menos porcentaje de costo de producción, y menor concentración de Melatonina.

Similar situación describe Cuerda, I. (2012) cuando los parámetros de motilidad no se vieron influenciados por la presencia de antioxidantes en el medio de congelación tras la descongelación. Sin embargo, si se observó un efecto negativo en las muestras tratadas con melatonina a una concentración de 5 mM tras un periodo de incubación a 37 °C durante 2 horas. Así pues, las muestras espermáticas congeladas con este antioxidante, tuvieron unos valores de VCL y ALH menores que los del control.

4.8 Discusión

En cuanto a la evaluación de la motilidad total (MT), el tratamiento con Melatonina (ME) en una concentración de 1 μM tuvo el mejor comportamiento, ya que inicio su descenso a las 72 horas, más tarde que el resto de tratamientos. En investigaciones realizadas por Martin-Hidalgo et al (2010), utilizando ME, señaló, que está, podía influir en la vida útil y la motilidad de los espermatozoides de verraco de una manera dependiendo de la dosis durante el almacenamiento líquido a 17 °C. La ME en dosis bajas (10,0 nM-1,0 μM) podía aumentar la motilidad de los espermatozoides de verraco y prolongar la vida útil, y 1,0 μM era la dosis óptima. Mientras tanto, la ME en altas concentraciones (1,0 mM, 5,0 mM) tuvo un efecto negativo sobre los espermatozoides; situación similar registrada en esta investigación con dosis de: T2 (10 μM), T3 (50 μM) y T4 (100 μM). En cuanto a la MP, esta disminuyó en todos los tratamientos a partir de las 24 horas; resultados similares reportados por Mejía y Párraga (2019), que, señalan, que el declive gradual de la motilidad espermática con relación al tiempo de conservación, se debe probablemente al efecto de peroxidación que ocurre en los espermatozoides.

En la evaluación de las velocidades, las muestras refrigeradas con T1 (1 μM) disminuyeron ($P < 0,05$) su VAP a las 48 h de almacenamiento; mientras que las muestras del resto de tratamientos (T0-T2-T3-T4), disminuyeron a las 24 horas; en la investigación de Hidalgo et., al (2010), se observó un aumento de tres indicadores de velocidad (VCL, VSL y VAP) sólo en el día 1 para los espermatozoides tratados con ME. Los valores más bajos se observaron para el tratamiento con ME en el Día 7 (144 horas), coincidiendo con el comportamiento de los resultados obtenidos en esta investigación. En este mismo estudio, el

aumento observado de VCL, VSL y VAP en el día 1 para los espermatozoides tratados con ME, podría deberse a un efecto inmediato de la ME a través de su receptor específico (ME1 y ME2). Por otra parte, Cuerda, (2012), indicó que, al evaluar diferentes antioxidantes, la melatonina a 5 mM obtuvo una VCL similar a los reportados en esta investigación.

En cuanto a la evaluación del índice de Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB), se determinó que todos los tratamientos disminuyeron según incrementó el tiempo de refrigeración. En el estudio realizado por Hidalgo et., al (2010) presentó similar comportamiento, ya que las muestras tratadas con ME, el LIN fue inferior a las muestras no tratadas.

Al hablar de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) presentó similar comportamiento que el índice de Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB), donde todos los tratamientos disminuyeron, según se incrementó el tiempo de refrigeración. En investigación realizada por Hidalgo et., al (2010) las muestras no tratadas con ME, el ALH fue significativamente superior a las tratadas, en el día 1 y 4. Este mismo autor señala que, si consideramos todos estos parámetros de motilidad en conjunto, podemos plantear la hipótesis de que los espermatozoides tratados con ME tienen tendencia a adoptar un estado hiperactivado. Schmidt y Kamp, 2004, demostraron que los espermatozoides hiperactivados presentan movimientos vigorosos y no lineales causados por un aumento de la amplitud de los latidos flagelares. Esta hipótesis concuerda con el estudio de Fujinoki, 2008, que demostró que, concentraciones de 1 pM a 1 M de ME en medio capacitante, potenciaban la hiperactivación de espermatozoides de hámster durante la incubación a 37 °C durante 4 h.

Al hablar de la evaluación de la integridad de la membrana plasmática, todos los tratamientos disminuyeron ($P < 0,05$) su Vitalidad según incrementó el tiempo de refrigeración. Las muestras refrigeradas con T0-T1-T2-T3 disminuyeron su Vitalidad a partir de las 48 h de almacenamiento; la muestra T4 disminuyó su Vitalidad a las 24h.

Estos resultados sugieren que la adición de ME al diluyente de refrigeración ejerció su efecto antioxidante y protector de la Membrana Plasmática al demostrar su integridad hasta las 48 h de refrigeración. Nuestros resultados son consistentes a los reportados por Flores, et al (2018) que encontraron el mismo efecto protector de la membrana plasmática al suplementar con 1,25 mM de ME en semen de cerdo. Por otra parte, vale señalar que en la investigación realizada por Hidalgo et., al (2010), reporto similar comportamiento, registrando en las muestras con ME, una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles de alrededor del 19 % al día 7. Hidalgo también señaló que este 19% es el resultado del incremento en el porcentaje de espermatozoides estáticos (muertos) después de 7 días de almacenamiento, resultados que concuerdan con los obtenidos en nuestra investigación.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La suplementación de melatonina al diluyente comercial Nutrixcell Ultra no mejoró los parámetros cinemáticos ni la vitalidad espermatozoides porcinos refrigerados a largo plazo. Sin embargo, la suplementación a dosis bajas de melatonina (1 μM) preservó la MT hasta las 72 h de almacenamiento en refrigeración. Además, dosis altas de melatonina (50 y 100 μM) provocaron la disminución más rápida de todos los parámetros cinemáticos y la vitalidad de espermatozoides porcinos refrigerados.

En el análisis costo beneficio se pudo observar que en T1 y T2 con un incremento en el costo (por el valor de la Melatonina) de (0,27% y 2,71%) respectivamente, se registró un tiempo de vida promedio de 60 y 69 horas, mientras que en los tratamientos T3 y T4 con porcentajes superiores en su costo (13,53 % y 27,05%), la respuesta antioxidante fue menor con (36h y 42h) respectivamente.

Los tiempos de Imacenamiento y temperatura influyen estadísticamente en la variabilidad de los datos, por eso que los coeficiente de variacion tienden a ser altos.

En consecuencia, se acepta la Hipótesis alternativa, ya que, con la dosis más baja de conservante, se consiguió prolongar la respuesta positiva de parámetros estudiados.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda seguir investigando, la adición de ME, disminuyendo las dosis utilizadas en esta investigación con dosis más bajas que las utilizadas en el tratamiento T2 (10 μ M ME).

Se recomienda continuar con la investigación de la viabilidad del semen porcino con la adición de ME para mejorar su calidad, estudiando su reacción acrosomal, reacción mitocondrial, estrés oxidativo, con el propósito de observar su acción antioxidante.

Se recomienda evidenciar mediante la investigación las propiedades antioxidantes de la ME en semen de verraco provando con refrigreación ya que es un tema poco estudiado en semen de verraco.

Se recomienda de ser el caso utilizar mayor número de unidades experimentales, con el propósito de obtener máyor variabilidad dentro de los resultados y observar su comportamiento.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Admin. (2014). Características del diluyente de semen porcino. rev redvet <http://cidosanet.net/noticias/caracteristicas-del-diluyente-de-semen-porcino>.
- Agrocalidad. (2010). Encuesta Nacional de Granjas de ganado porcino. <http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2013/08/7%20Informe%20Encuesta%20Nacional%20Sanitaria%20de%20Granjas%20de%20Ganado%20Porcino%202012.pdf>
- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 60: 32-41.
- Abdul-Aziz M, Meriano J, Casper RF, 1996: Intracytoplasmic sperm injection for treatment of infertility due to acrosomal enzyme deficiency. *Fertil.Steril.* 65 977-980.
- Aleman D, Alfaro M, Hurtado E. (2007). Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas. *Zootecnia Tropical*. Universidad de Oriente; p. 71-75. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3597/Articulos-porcino-archivo/Efecto-de-la-temperatura-del-semen-sobre-la-respuesta-reproductiva-de-cerdas.html>
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT, 1987: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8 338-348.
- Althouse, G., Levis, D., & Diehl, J. (2001). Semen Collection, Evaluation and Processing in the Boar. *Pork Information Gateway*, 1–6.
- Arias Miro, María. 2015. Valoración Seminal. Citómetro de Flujo. Tema 8: Reproducción en el Macho http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/22_17_15_Tema_8.pdf

ASPE, (2018). Informativo Porcino n° 78, 4to Trimestre 2018. págs. 20-21, A partir de datos de ASPE (Asociación de Porcicultores del Ecuador):

https://www.3tres3.com/articulos/produccion-porcina-en-ecuador_40926/#:~:text=30.000%20Tm%20Fa%C3%B1o.-,El%20C3%BAltimo%20censo%20agropecuario%20de%202017%20mostr%C3%B3%20que%20la%20poblaci%C3%B3n,la%20producci%C3%B3n%20porcina%20en%20Ecuador.

Ávalos, R. A., González, S. J. A., Vargas, I. A. K., y Herrera, B. J. A. (Eds). (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. Universidad Autónoma Metropolitana. http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf

Bailey, J.L., Lessard Ch., Jacques, J., Brèque, Ch., Dobrinski, I., Zeng, W., Galantino-Homer, H.L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry, *Theriogenology*, Volume 70, Issue 8, 2008.

BAVISTER, B.D. (1990). Tests of sperm fertilizing ability. En: Asch, R.H., J. P. Balmaceda e I. Johnston (eds). *Gamete Physiology*. Serono Symposia, USA, Norvell, Mass., pp. 70-105. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=748450&pid=S0301-732X199800010001000002&lng=es

Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT, (2002). Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr.Top.Med.Chem.* 2 113-132.

Benítez, W. (2000). Estudio FAO producción y Sanidad Animal. <http://www.fao.org/3/a-y2292s.pdf>

- Bonet, S., Casas, I., Holt, W., & Yeste, M. (2014). *Boar Reproduction: Fundamentals and new biotechnological trends* (Vol. 1). London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bonet, S., Garcia, E., & Sepúlveda, L. (2013). The boar reproductive system. In *Boar Reproduction* (pp. 65-107). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Broekhuijse M, Šoštarić E, FeitsmaH, and Gadella B. (2012). The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. *Theriogenology* 77(7):1466-1479.
- Campos, C. (2015). Efeitos da utilização de plasma seminal sintético (predil® mra®) no desempenho reprodutivo da porca. Universidad de Lisboa.
- Castillo R. (2006). Inseminación artificial en cerdas. In: *Producción de Cerdos*, Castillo R. (ed). Academic Press. 90 p.
- Carpio, F. O. (2004). ORDENANZA MUNICIPAL PARA LA PROTECCION DE LOS ANIMALES SILVESTRES Y DOMESTICOS. Cuenca: CONCEJO CANTONAL.
- CIAT. (1998). Experiencias de los Comites de Investigacion Agrícola Local, CIAL, en America Latina. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Cordova, A, Lang, CGR, Jiménez, CAC, Jiménez, MSC, Liera, JEG, Denis, BER, & Salinas, KA (2009). ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA/OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS IN THE SPERMATIC CONSERVATION. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* , 3 (1), 1. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53689644/23620-23639-1-PB-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1669658320&Signature=KFdRBW2i0Dt~M9dmKrs1raxChn69Dppq3k-esOqsfefQY1Fbf0EI9Ehl~LdV27QHk93~5iVF~hEiLy->

JfBRzUO10YhhYYMjHF92CTyLSlvRY~rX4RZppuKpWgdU1mu-hEUu9p-
X6elWfhpfE31IOcnQMn6iHPeFq6gl8GwMqPt0ZiAtj1zCfB9XAJb87ru9IySriheZuz
GuXbSgLv5uKoDaRCeS7QXx2VJXKAiCaDyBmYEqwOA0jOozSJTduqWt7NnbFz
vrPELKC0O14k2hDfTSGW-
m1mRzGI07A~gLrdlbJOkOeTyhO9Mw5PzoH2uYj~fofKxZCmQsNO-
sQFMw &Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Córdova, A., Pérez, J., Méndez, W., Villa, A., y Huerta, R. (2015). Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Revista Mexicana*, 26 (1), 69-74.

<https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/253>

Conejo J, Becerril J, Ortega R.(1996). Diluyentes utilizados en la conservación de semen porcino en estado líquido. <https://www.cic.umich.mx/proyectos-de-investigacion/2016-2017/proyectos-aprobados/75-facultad-medicina-veterinaria-y-zootecnia.html>.

Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG, Betancourt M. (2003). Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Arch.Androl* 49 287-295.

Condoy, C., Cevallos A. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *rev redvet*.

Cuenca, C. M., y Avallaneda, C. J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18 (9), 1-11.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009012>

Cuerda, I. (2012) “Efecto de diferentes concentraciones de los antioxidantes melatonina, crocina y trolox sobre la calidad seminal a la descongelación en Ciervo Ibérico” Universidad de

Castilla la Mancha Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos.

<https://digital.csic.es/bitstream/10261/147424/1/crocinatrolox.pdf>

Cueto, M., Gibbos, A., Bruno, G. M. M., y Fernández, J. (2016). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. INTA.

Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. Veterinaria México 33.

Cruz, W (2013). Efecto de dosis de espermatozoides y tiempos de inseminación artificial en cerdas multíparas en la parroquia zapotal provincia de santa elena. La libertad, Universidad estatal península de Santa Elena.

De Alba Romero C. (2015). Actualización de la técnica de aplicación de semen en la especie porcina. Minitub Ibérica S.L. México.

Diaz M, Arévalo A. (2006). Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=5328>

Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP, (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. Eur.J Pharmacol. 345 67-69.

Drobnis, EZ, Crowe, LM, Berger, T., Anchordoguy, TJ, Overstreet, JW y Crowe, JH. (1993). El daño por choque frío se debe a las transiciones de fase lipídica en las membranas celulares: una demostración que usa espermatozoides como modelo. Exp. J. Zool., 265: 432-437. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>.

Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM, (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 355 365-375.

- Falconí C, Paredes M. (2011). Sistemas de producción del cerdo criollo. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3861/1/T-ESPE-IASA%20I-004550.pdf>.
- Flores, C., Meléndez, C., Mendoza, C., Márquez, Y., & Vilanova, L.T. (2018). Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Revista veterinaria*, 29(1), 13-17. <https://dx.doi.org/10.30972/vet.2912780>.
- Fujinoki, M. 2008. Hiperactivación del esperma de hámster potenciada por melatonina. *Reproducción*, 136, pp. 533 – 541.
- Gadea, J (2003). Los diluyentes de inseminación artificial porcina, *Spanish Journal of Agricultural Research*. p. 17-27. Disponible en: <http://www.agrodigital.com/upload/gadea%20sjar2003-espa%C3%B1ol.pdf>
- Gadea J. (2005). El uso de semen porcino congelado. Murcia: Mundo Ganadero.
- Guerrero JM, Reiter RJ, 2002: Melatonin-immune system relationships. *Curr.Top.Med.Chem.* 2 167-179.
- González, W. E.; Garbuno, R. y Palomares, H. (1991). Efecto de algunos factores ambientales sobre la producción de semen. Congreso de la Asociación Latina de Veterinarios Especialistas en Cerdos. La Habana.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le LD, 1995: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod.Fertil.* 103 17-26.
- Guachún, M. (2017). Efecto del extracto del Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) en la congelabilidad del semen porcino. Cuenca, Universidad de Cuenca.
- Hafez E. y B. Hafez. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos*. 7ma ed. Editorial Interamericana. México.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=2613888&pid=S0798-7269200700020000200005&lng=es

Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88. 1990.

Hardeland R, 2005: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 27 119-130.

Hernandez, Diaz JL. (2009). Evaluación de un nuevo diluyente para semen porcino. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.* p. 1-5.
<http://www.redalyc.org/pdf/636/63611961005.pdf>

Hernández, A. (2013). Viabilidad y función espermática de semen descongelado de porcino adicionado con plasma seminal homólogo. Universidad Veracruzana.
<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/33713/hernandezdominguezana.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Hicks JJ, Torres RY, Sierra VM, 2006: Estrés oxidativo. Concepto y Clasificación. *Endocrinología y Nutrición* 4 223-226.

D. Martín-Hidalgo, F.J. Barón, M.J. Bragado, P. Carmona, A. Robina, L.J. García-Marín, M.C. Gil. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C, *Theriogenology*, Volume 75, Issue 8, 2011, Pages 1550-1560, ISSN 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.021>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1000676X>)

Hidalgo, L. (2017). Polyphenols of thyme (*Thymus vulgaris*) and ginger (*Zingiber officinale*) in the feeding of local hens. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 10, 88-93.

- Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB & Curnock RM. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. *J Androl* 18: 312-323.
- Huo LJ, Ma XH, Yang ZM. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58 1349-1360.
- Jones R, Mann T, 1977: Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod.Fertil.* 50 261-268.
- Jones R, Mann T, Sherins R, 1979: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil.Steril.* 31 531-537.
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fisher, P and Maxwell, W. M.C. (2000). Storage of boar semen *Animal Reproduction. Science* 62 2000 143–172.
www.elsevier.com/locate/reproscion.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R, 1989: Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 24 185-196.
- Juarez, JD. (2009). Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de espermatozoides porcinos. Tesis Master Of Scienca. Universidad Politecnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/14316>
- Kitay JI, 1954: *The Pineal Gland*. Cambridge: Harvard Universiti Press.
- Kubus. (2010). *Inseminación Artificial Porcina*. Madrid: kubus S.A.
- LE COZ P (2007). La dilución y la conservación. https://www.3tres3.com/inseminacion_artificial/la-dilucion-y-laconservacion_4032/

- López, A., Rijsselaere, T., Beek, J., Vyt, P., Van, A., & Maes, D. (2013). Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Syst Bio Reprod Med*, 59(1), 5–12. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.725120>
- Lopez Rodriguez, Alfonso & Rijsselaere, Tom & Vyt, Philip & Soom, Ann & Maes, Dominiek. (2011). Effect of Dilution Temperature on Boar Semen Quality. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 47. e63-6. 10.1111/j.1439-0531.2011.01938.x.
- López-Gatius, F., Sances, G., Sancho, M., Yániz, J., Santolaria, P., Gutiérrez, R., Núñez, M., Núñez, J., Soler, C., 2005. Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 64:252-260.
- Maqueda L. (2004). Conservación de la calidad del Semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte. <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/conservacion-semen-diluyentes-empaque-temperatura-y-transporte-t25879.htm>
- Martín-Hidalgo, D., Barón, F.J. A., Robina, M.J. Bragado, A. Hurtado de Llera, L.J. García-Marín, M.C. Gil. (2013). Inter- and intra-breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and Duroc boar semen during long-term storage in MR-A and XCell extenders, *Animal Reproduction Science*, Volume 139, Issues 1–4, 2013.
- Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel-H, Evans G. (2006). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Faculty of Veterinary Science, University of Sydney*, 64:13-38. <https://www.bioscioproceedings.org/bp/0006/bp0006rdr2.pdf>.
- Mejía, L y Párraga, B. (2019). Efecto de la adición de la vitamina c como antioxidante en el semen fresco del porcino. Trabajo de titulación: Escuela Superior Politécnica de Manabí. Repositorio ESPAM-Ecuador.

- Membrillo OA, Córdoba IA, Hicks GJJ, Olivares CIM, Martínez TVM, Valencia MJJ, 2003: Peroxidación Lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia* 28 699-704.
- Meyers SA, 2001: Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod.Sci.* 68 291-303.
- MICROPTIC .(2022). MICROPTIC AUTOMATIC DIAGNOSTIC SYSTEMS. Registro Mercantil de Barcelona. <https://www.micropticsl.com/es/productos/sca-sistema-casa/modulos-de-analisis-vet/sca-movilidad-y-concentracion-para-veterinaria/>
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay: INIA.
- Moscardini, M. M., Scott, C., Souza, M. D., Torre, L. T., Vallejo, A. V. H., y Ferreira, de S. A. (2014). Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración. *Ci. Vet*, 21 (2), 122-126. <https://dx.doi.org/10.4322 / rbcv.2014.035>
- NUTRIXcell Ultra, (2019). *Nutrixcell-ultra_EN.pdf* (imv-technologies.es)
- Olguín, CG., Guiller, GM., Zúñiga, RRA., Pasqueti, PA. (2004): Antioxidantes y aterosclerosis. *Endocrinología y Nutrición* 12 199-206.
- Ordoñez, W. (2017). Eficacia de la radiación ultravioleta en la esterilización del plasma seminal porcino y su comportamiento sobre la calidad espermática. Tesis Magister en Reproducción Animal. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27427/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>.

- Ochoa, G., Acosta, M., Rueda, M., Ortega, R. (2008). Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. Pruebas in vitro/Conservation of pig semen. Revista Computadorizada de Producción Porcina, Volumen 15. 2008; p. 298.
http://www.iip.co.cu/RCP/153/153_10artGOchoaB.pdf.
- Ochoa, R. (2002). Situación de la porcicultura en el Ecuador. Revista La Granja, N 5.
- Palma, G. (2008). Biotecnología de la Reproducción. 2ª edición, Mar del Plata, Argentina.
- Pérez A, Puente F, Pardo R. (2015). Evaluación de la calidad seminal en sementales porcinos en un Centro de Inseminación Artificial. rev redvet.
- Pérez Sánchez, L. M. (2008). Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. [Tesis de Licenciatura, Universidad de la Salle].
https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1122&context=medicina_veterinaria
- Peyrot F, Ducrocq C, 2008: Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. J Pineal Res 45 235-246.
- Rath D, Bathgate R, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Strzezek J, Waberski D.(2009). Recent advances in boar semen cryopreservation. Soc.Reprod.Fertil.Suppl 66 51-66.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E, 2000: Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. J Biomed.Sci. 7 444-458.
- Reiter RJ, 1991: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr.Rev. 12 151-180.
- Reiter RJ, 1980: The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. Endocr.Rev. 1 109-131.

- Reiter RJ, Hester RJ, 1966: Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. *Endocrinology* 79 1168-1170.
- Ressmeyer, R, Mayo, C, Zelosko, V., Sáinz, M, Tan, DX, Poeggeler, B., ... & Hardeland, R. (2003). Propiedades antioxidantes del metabolito de la melatonina N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK): eliminación de radicales libres y prevención de la destrucción de proteínas. *Informe redox*, 8 (4), 205-213. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/135100003225002709>
- Rivera, C. (2012) Inseminación Artificial en cerdas, DSpace ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/browse?type=author&value=Rivera+Cisneros%2C+Marco+Vinicio>
- Rodríguez Martínez, H., Kvist, U, Ernerudh, J., Sanz, L, & Calvete, J., (2011). Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play?. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*. (66), 11-22. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:433553/FULLTEXT01.pdf> Heriberto
- Roca J., Martínez S., Vázquez JM., Lucas X., Parrila I., and Martínez EA. (2000). "Viability and Fertility of Rabbit Spermatozoa Diluted in Tris-Buffer Extenders and Stored at 15°C." *Animal Reproduction Science* 64(1-2):103-12.
- Rodríguez-Martínez H, (2005). Evaluación de la calidad seminal en el verraco. *Avances en tecnología porcina*, vol. 2, nº 7-8.
- Román, JA y Román, JL. (2018). Parámetros reproductivos de cerdas inseminadas artificialmente con semen fresco y cerdas cubiertas con monta natural en clima cálido-húmedo en Tuxpan, guerrero. Universidad Autónoma de México, Guerrero, Mexico.

- Rueda M, Perdigon R, Arias T, Mendoza D, Benitez J, Lemus S, et al. (2009). Diluyentes cubanos de semen porcino. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. p. 26-29.
http://www.iip.co.cu/RCP/161/161_03artMRueda.pdf
- Rugeles C, Caicedo R, Almentero C, Linares J, Vergara O. (2013). Viabilidad de semen porcino refrigerado con MRA. Universidad del Zulia, Venezuela.
<http://www.redalyc.org/html/959/95926665007/>.
- Rubio-Guillén, Jorge L, Quintero-Moreno, Armando A, & González Villalobos, Decio M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*, 19(4), 382-389. Recuperado en 25 de octubre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592009000400010&lng=es&tlng=es.
- Sánchez, R. (2007). Congelación de semen en porcino. *Historia y evolución*.
http://www.3tres3.com/los-expertos-opinan/congelacionde-semen-en-porcino-historia-y-evolucion_1767/
- Sancho, S., & Villagran, IN. (2014). The Boar Ejaculate: Sperm Function and Seminal Plasma Analyses. In *Boar Reproduction: Fundamentals and new technological trends* (pp. 471–515). London: Springer.
https://www.researchgate.net/publication/278647901_The_Boar_Ejaculate_Sperm_Function_and_Seminal_Plasma_Analyses
- Schulze, Martin & Henning, Heiko & Rüdiger, K & Wallner, U. & Waberski, Dagmar. (2013). Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology*. 80.
10.1016/j.theriogenology.2013.07.026.

- Schmidt, H, G. Kamp 2004. Hiperactividad inducida en espermatozoides de verraco y su evaluación mediante análisis de semen asistido por computadora. *Reproducción*, 128, pp. 171 –179.
- Srivastava PN, Abou-Issa H, 1977: Purification and properties of rabbit spermatozoal acrosomal neuraminidase. *Biochem.J* 161 193-200.
- Srivastava PN, Zaneveld LJ, Williams WL, 1970: Mammalian sperm acrosomal neuraminidases. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 39 575-582.
- Stetson MH, Elliott JA, Menaker M, 1975: Photoperiodic regulation of hamster testis: circadian sensitivity to the effects of light. *Biol.Reprod.* 13 329-339.
- Tamayo, M. (2013). La selección de sementales bovinos en Cuba. Calidad de la producción seminal en futuros sementales Holstein. *Red Vet*, 14(1).
- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ, 2008: Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod.Toxicol.* 25 291-303.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ, 2007: One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42 28-42.
- Tanyildizi S, Bozkurt T, 2003: Effects of acetylsalicylic acid and metamizol on hyaluronidase activity and sperm characteristics in rams. *Anim Reprod.Sci.* 76 195-204.
- Tanyildizi S, Bozkurt T, Üft O, Sakun F, 2006: In Vitro Effects of melatonin on Hyaluronidase Activity and Sperm Motility in Bull Semen. *Turk J Vet Anim Sci* 30 89-93.
- Tardif, S. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. En: *Theriogenology*. Vol. 52; p. 447-459.
- Toalombo, P. (2007). Evaluación de la inseminación intrauterina profunda y cervical en cerdas. Riobamba: Escuela Superior de Chimborazo.

- Torrenes, R., Torrez, K., Vanegas D, López, J., Guevara, L. (2013). Manual de inseminación artificial porcina. CENIDA, Nicaragua; <http://cenida.una.edu.ni/textos/NL10U58.pdf>
- Torres P, Fischman M, Acerbo M, Garcia C, Miguez M, Dominguez J, et al. (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días. <http://scielo.isciii.es/pdf/azoo/v63n243/nota2.pdf>.
- Turek FW, Desjardins C, Menaker M, 1976: Melatonin-induced inhibition of testicular function in adult golden hamsters. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 151 502-506.
- Trejo, C. A., Meza, V. V. M., Antonio, E. C., Cotera, R. J., y Antonio, C. C. M. (2013). Agua de coco (*Cocus nucifera*) como diluyente para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Arch. Zootec*, 62 (238), 299-302. <https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922013000200017>
- Valencia, C.E. (2006). Elaboración de diluyentes de semen porcino. Tesis Doctoral, Escuela Politécnica Nacional (EPN). <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
- Van Vuuren RJ, Pitout MJ, van Aswegen CH, Theron JJ, 1992: Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clin.Biochem.* 25 125-127.
- Venéreo GJR, 2002: Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Med Milit* 31 126-33.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. (2001) Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Vilela, D. (2014). Influencia del plasma seminal en la criopreservación espermática y en la separación de espermatozoides X e Y en la especie porcina. Universidad de Murcia. <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/41208/1/Tesis%20Diego%20Vilela%20Alkmin.pdf>

