

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**DIRECCIÓN DE CARRERA PECUARIA**

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

**MODALIDAD: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA PORCINA  
SOMETIDA A LOS DISTINTOS NIVELES DE COENZIMA Q10 Y  
VAPOR DE NITRÓGENO DURANTE LA CONGELABILIDAD**

**AUTORES:**

**CRISTHIAN DAMIÁN BUSTE ALCÍVAR  
MARÍA JOSÉ GARCÍA LUCAS**

**TUTOR:**

**M.V. MARCOS ANTONIO ALCÍVAR MARTÍNEZ, MG.**

**CALCETA, NOVIEMBRE 2022**

## DERECHOS DE AUTORÍA

Cristhian Damián Buste Alcívar y María José García Lucas, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.



---

Cristhian D. Buste Alcívar  
C.I. 1315811420

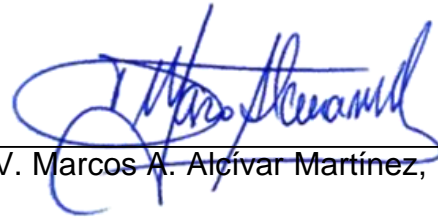


---

María J. García Lucas  
C.I. 1312112525

## CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Marco Antonio Alcívar Martínez certifica haber tutorado la tesis EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA PORCINA SOMETIDA A LOS DISTINTOS NIVELES DE COENZIMA Q10 Y VAPOR DE NITRÓGENO DURANTE LA CONGELABILIDAD, que ha sido desarrollada por Cristhian Damián Buste Alcívar y María José García Lucas, previa a la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO DE UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL DE PROGRAMAS** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



---

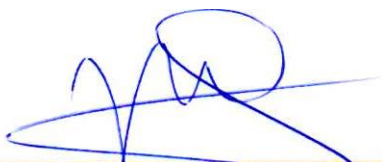
M.V. Marcos A. Alcívar Martínez, MG.

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** la tesis EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA PORCINA SOMETIDA A LOS DISTINTOS NIVELES DE COENZIMA Q10 Y VAPOR DE NITRÓGENO DURANTE LA CONGELABILIDAD, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Cristhian Damián Buste Alcívar y MaríaJosé García Lucas, previa a la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO DE UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL DE PROGRAMAS** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



\_\_\_\_\_  
MVZ. Heberto D. Mendieta Chica, Mg. Sc  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



\_\_\_\_\_  
MV. Carlos A. Rivera Lectong, Mg. Sc.  
**MIEMBRO**



\_\_\_\_\_  
Dr. Vinicio A. Chávez Vaca, Mg. Sc.  
**MIEMBRO**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

Agradezco a Dios por ser quién me ha dado la inteligencia, conocimiento por su guía y darme la fortaleza para alcanzar mis metas y objetivos.

A mi Madre y mi Padre por su apoyo incondicional, ya que sin su ayuda no hubiera logrado culminar mi carrera universitaria y a la vez me dieron ánimo para no desertar y seguir creyendo en mis capacidades.

Así mismo agradezco a mi tutor de tesis por haberme guiado en la elaboración de este trabajo de titulación. A los maestros que de una u otra forma aportaron con sus conocimientos.

Cristhian D. Buste Alcívar

## AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

Quiero expresar mi gratitud a Dios que con su bendición me ha permitido lograr esta meta, a mi madre María Lucas Cedeño por su apoyo y amor incondicional, por sus consejos diarios para no desvanecer en los momentos complicados en mis años de estudio, a mi segunda madre mi *Chini* por estar en los momentos difíciles demostrándome que ella es mi ángel que siempre que pueda estará ahí para ayudarme incondicionalmente.

A mi tutor Dr. Marcos Alcívar por su orientación durante la redacción y ejecución de la tesis de grado.

No puedo dejar de agradecer a mis compañeros por su apoyo y constancia durante las horas de trabajo a lo largo de nuestra formación, que poco a poco estamos culminando esta maravillosa aventura.

María J. García Lucas

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por permitirme llegar hasta este momento importante de mi formación académica, a quien entrego lo adquirido, y en el proceso estuvo conmigo.

A mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y darme el ánimo y fuerzas para seguir adelante.

De manera muy especial a mi madre, por ser un pilar fundamental a lo largo de mi carrera académica, quien me enseñó que el mejor conocimiento, es el que se aprende por sí mismo y que incluso, la tarea más grande se puede lograr si se hace un paso a la vez.

A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa aportando a mi formación profesional, personas que ya no están y que creyeron, que lo podía lograr, a mi prometida M.J.S. No fue fácil el proceso, pero de la mano de DIOS todo es posible.

Cristhian D. Buste Alcívar

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo va a dedicado principalmente a Dios por ser el inspirador y darme su bendición para continuar en este proceso de obtener uno de mis anhelos más deseados; durante el desarrollo de la tesis se presentaron muchos obstáculos de los cuales en muchos me quise rendir, pero siempre tenía un consejo y una frase muy cierta, El tiempo de Dios es perfecto.

Tengo el orgullo y privilegio de tener dos madres María Lucas y Chini gracias por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, por ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy y seré.

María J. García Lucas



## TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTORÍA .....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR .....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....	iv
TABLA DE CONTENIDO .....	ix
LISTA DE CUADROS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES .....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	3
1.3. OBJETIVOS .....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. HIPÓTESIS .....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CERDO .....	5
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CERDO.....	5
2.3. ANDROLOGÍA PORCINA.....	5
2.4. ÓRGANOS SEXUALES PRIMARIOS .....	6
2.4.1. TESTÍCULOS .....	6
2.4.2. ESCROTO .....	6
2.5. ÓRGANOS SEXUALES SECUNDARIOS.....	7
2.5.1. EPIDÍDIMO .....	7
2.5.2. CONDUCTO DEFERENTE .....	7
2.5.3. VESÍCULAS SEMINALES .....	7
2.5.4. PRÓSTATA .....	7
2.5.5. PENE .....	8
2.5.6. PREPUCIO .....	8
2.6. CARACTERÍSTICAS DE LA RAZA YORKSHIRE.....	8
2.6.1.1. APARIENCIA GENERAL.....	8
2.6.2. YORKSHIRE.....	8
2.7. PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA .....	9

2.8. EYACULADO Y SUS FRACCIONES .....	9
2.8.1. FRACCIÓN PRE ESPERMÁTICA .....	9
2.8.2. FRACCIÓN ESPERMÁTICA O RICA EN ESPERMATOZOIDES .....	9
2.8.3. FRACCIÓN POST ESPERMÁTICA .....	9
2.9. CALIDAD SEMINAL .....	10
2.10. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA .....	10
2.10.1. VOLUMEN .....	10
2.10.2. COLOR .....	10
2.10.3. OLOR .....	10
2.10.4. pH .....	10
2.11. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA .....	10
2.11.1. VITALIDAD .....	11
2.11.2. MOTILIDAD .....	11
2.11.3. ANOMALÍAS ESPERMÁTICAS .....	11
2.11.4. ENDOSMOSIS CELULAR .....	11
2.11.5. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA .....	12
2.11.5.1. ESCALA DE VIGOR ESPERMÁTICO DE ACUERDO A LA MOTILIDAD .....	12
2.11.6. AGLUTINACIÓN .....	13
2.11.7. CONCENTRACIÓN .....	13
2.12. ENVEJECIMIENTO CELULAR .....	13
2.13. ESTRÉS OXIDATIVO .....	14
2.14. CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA .....	15
2.15. ANTIOXIDANTES .....	16
2.16. COENZIMA Q10 .....	17
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO .....	19
3.1. UBICACIÓN .....	19
3.1.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA .....	19
3.1.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS .....	19
3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS .....	20
3.2.1. MÉTODOS .....	20
3.2.2. TÉCNICAS .....	20
3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO .....	20
3.4. FACTORES DE ESTUDIO .....	21
3.5. TRATAMIENTOS .....	21

3.5.1. ARREGLO DE TRATAMIENTOS .....	21
3.6. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA.....	23
3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL .....	23
3.8. VARIABLES EN ESTUDIO.....	23
3.8.1. VARIABLES INDEPENDIENTES .....	23
3.8.2. VARIABLE DEPENDIENTE.....	23
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
3.10. PROCEDIMIENTO .....	24
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. VITALIDAD DEL SEMEN .....	27
4.2. MORTALIDAD DEL SEMEN .....	28
4.3. MOTILIDAD MASAL.....	29
4.4. BORDE APICAL NORMAL (NAR).....	29
4.5. BORDE APICAL DAÑADO (DAR).....	30
4.6. GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL (GCS) .....	31
4.7. GOTA CITOPLASMÁTICA DISTAL (ECD).....	31
4.8. ANÁLISIS ECONÓMICO.....	32
4.9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	32
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	35
5.1. CONCLUSIONES .....	35
5.2. RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA .....	37
ANEXOS .....	41

## CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 3.1. Características climáticas	20
Cuadro 3.2. Esquema de los tratamientos	21
Cuadro 3.3. Esquema del ADEVA	23
Cuadro 4.1. ADEVA para variable vitalidad del semen (%)	27
Cuadro 4.2. Prueba de Tukey al 5% de significancia para variable vitalidad del semen (%)	28
Cuadro 4.3. ADEVA para variable mortalidad del semen (%)	28
Cuadro 4.4. Prueba de Tukey al 5% de significancia para variable mortalidad del semen (%)	29
Cuadro 4.5. ADEVA para variable motilidad masal	29
Cuadro 4.6. ADEVA para variable borde apical normal (%)	30
Cuadro 4.7. ADEVA para variable borde apical dañado (%)	30
Cuadro 4.8. Prueba de Tukey al 5% de significancia para variable borde apical dañado (%)	31
Cuadro 4.9. ADEVA para variable gota citoplasmática proximal (%)	31
Cuadro 4.10. ADEVA para variable gota citoplasmática distal (%)	32
Cuadro 4.11. Análisis económico	32

## RESUMEN

El presente estudio consistió evaluar la calidad de semen porcino sometida a distintos niveles de coenzima Q10 a diferentes niveles de vapor de nitrógeno durante la congelabilidad. Para este fin se implementó un ensayo experimental con diseño DBCA con análisis de varianza, previamente se comprobaron los supuestos de normalidad de los datos (Shapiro-wilks) y homogeneidad de varianzas (Bartlett) y la prueba de Tukey para establecer el nivel de significancia de los resultados mediante paquete estadístico InfoStat versión 2017. Se midió el efecto de la coenzima Q10 (0,04 y 0,06mg/mL) y la crioconservación con vapor de nitrógeno (5cm, 10cm, 15cm); las variables evaluadas fueron vitalidad, mortalidad y motilidad del semen; borde apical normal-dañado, gota citoplasmática proximal-distal y relación costo beneficio. Los resultados indican diferencias estadísticas altamente significativas para la variable vitalidad del semen ( $p < 0.0001$ ), mortalidad del semen ( $p < 0.0001$ ) y variable borde apical dañado ( $p < 0.0001$ ); no hubo diferencias estadísticas para el resto de variables. En términos económicos todos los tratamientos generaron pérdidas económicas al analizar la producción de 1000 pajuelas por cada tratamiento. La crioconservación no representa un método apropiado debido a las alteraciones estructurales y funcionales desarrolladas durante los cambios de temperaturas post congelación y descongelación del semen, motivo por el que no se sugiere su uso a nivel comercial.

**Palabras clave:** Semen, congelación, crioconservación, vitalidad, motilidad.

## ABSTRACT

The present study consisted of evaluating the quality of boar semen subjected to different levels of coenzyme Q10 at different levels of nitrogen vapor during freezability. For this purpose, an experimental trial with DBCA design with analysis of variance was implemented, previously the assumptions of normality of the data (Shapiro-wilks) and homogeneity of variances (Bartlett) and the Tukey test were verified to establish the level of significance of the results through statistical package InfoStat version 2017. The effect of coenzyme Q10 (0.04 and 0.06 mg/mL) was measured, and cryopreservation with nitrogen vapor (5 cm, 10 cm, 15 cm); the variables evaluated were vitality, mortality and semen motility; Normal-damaged apical edge, proximal-distal cytoplasmic droplet and cost-benefit ratio. The results indicate highly significant statistical differences for the semen vitality variable ( $p < 0.0001$ ), semen mortality ( $p < 0.0001$ ) and the damaged apical edge variable ( $p < 0.0001$ ); there were no statistical differences for the rest of the variables. In economic terms, all treatments generated economic losses when analyzing the production of 1000 straws for each treatment. Cryopreservation does not represent an appropriate method due to the structural and functional alterations developed during temperature changes after freezing and thawing of semen, which is why its use is not suggested commercially.

**Keywords:** semen, freezing, cryopreservation, vitality, motility.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En los últimos tiempos la aceptación de la tecnología de inseminación artificial a nivel mundial, en el ganado porcino ha dado importantes mejoras en la crianza de cerdos y a su vez transformado la producción porcina comercial, dando un desarrollo de otras tecnologías como la crioconservación, (Toalombo, 2007). Esta técnica tiene gran trascendencia y un papel importante en la conservación y propagación de recursos genéticos, que a su vez está comprometida a la supervivencia del semen lo que provoca un descenso en la calidad seminal (Williams, 2017).

Membrillo *et al.* (2011) plantean que la crioconservación de semen provoca daños en la integridad de la membrana y que produce pérdida de motilidad y viabilidad. El efecto que provoca el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación ocasiona cambios en la membrana espermática, ya que esta desestabiliza y altera la homeostasis del calcio, daña el cromosoma y causa trastornos lipídicos (Guachún, 2017).

Córdova *et al.* (2009) ratifican, que el estrés oxidativo de los espermatozoides es el daño que sufren los componentes estructurales y fisiológicos; lo que disminuye la sobrevivencia y capacidad fecundante e induce a la formación de radicales libres que poseen un electrón no apareado y un conjunto de especies reactivas al oxígeno (ROS), formándose durante el manejo del eyaculado; las principales ROS que se conocen, tienen relación con la funcionalidad espermática son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , precursor de radical) e hidroxilos ( $-OH$ ); Aumenta los espermatozoides muertos.

Un estudio realizado donde se comparó la motilidad espermática conservados en dos tipos de diluyentes en diferentes tiempos en la conservación, determinó que uno de los principales problemas de los diluyentes es la baja resistencia de los espermatozoides que muestra después de la descongelación, corta durabilidad de la viabilidad espermática y que disminuye los parámetros de calidad seminal ya que afecta la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Cuenca y Avellaneda, 2017).

De acuerdo con la literatura reportada se considera que la crioconservación es una técnica importante en la conservación y propagación de recursos genéticos pero que a su vez provoca un descenso en la calidad seminal, afecta la membrana y produce pérdida de motilidad y viabilidad del semen, por lo que ocasiona el estrés oxidativo. Estas referencias permiten plantear la siguiente interrogante. ¿Los niveles coenzima Q10 como antioxidante asociados a los niveles de vapor de nitrógeno ayudarán a conservar las características de la membrana celular y la calidad espermática durante el proceso de congelación?



## 1.2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se han manifestado diferentes técnicas que contribuyen al desarrollo de la industria porcina en las que destaca las biotecnologías reproductivas, esto ha logrado avanzar tecnológicamente la producción como lo es la inseminación artificial relacionada con la crioconservación del eyaculado, industria muy importante que han permitido el aumento de uso de sementales de alto valor genético y que así se obtiene un mejor control de calidad de semen (Restrepo, 2008).

Un estudio realizado por Medina *et al.* (2008) afirman, que la crioconservación mantiene las características espermáticas en cuanto a movilidad y velocidad. Para reducir los daños en el espermatozoide, se han efectuado numerosos diluyentes, estos permiten su almacenamiento por mucho tiempo, estos tipos de diluyentes tienen sustancias crioprotectoras llamadas antioxidantes y su función es evitar que las moléculas se unan al oxígeno para así regular la permeabilidad de la membrana plasmática y así impedir su peroxidación lipídica (Intriago y Vargas, 2019).

Rugeles *et al.* (2013) argumentan, que los diluyentes aportan con nutrientes para mantener la célula espermática, previene el shock térmico por frío y controla el pH, la presión osmótica y el desarrollo microbiano. Reduce la permeabilidad de la membrana espermática, elimina enzimas intracelulares en el semen, los responsables de los Radicales del estrés oxidativo (ROS) al igual altera el balance iónico que es culpable de los trastornos en el metabolismo aeróbico y anaeróbico del glucógeno (Guachún, 2017).

Rodríguez y Nivia (2017), deducen que los antioxidantes en el semen porcino tienen la capacidad de retrasar la oxidación, así brindan una mayor sobrevivencia espermática. Son incluidos en los diluyentes, ayuda a mantener la integridad del semen y evita que las moléculas se unan al oxígeno, regula la permeabilidad de la membrana plasmática impide su peroxidación lipídica, el uso de la coenzima Q10 como antioxidante, aumenta el tiempo de conservación del semen en el proceso de congelación (Intriago y Vargas, 2019)

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad espermática porcina sometida a distintos niveles de coenzima Q10 a diferentes niveles de vapor de nitrógeno durante la congelabilidad.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el efecto de la coenzima Q10 como antioxidante espermático en los distintos niveles de vapor de nitrógeno post congelación.

Establecer la interacción de la aplicación de la coenzima Q10 con los distintos niveles de vapor de nitrógeno sobre la calidad espermática post congelación.

Estimar el valor costo beneficio de la coenzima Q10 como antioxidante y los distintos niveles de vapor de nitrógeno en el proceso de congelación del semen porcino.

### **1.4. HIPÓTESIS**

La coenzima Q10 al nivel de 0,04 mg/mL como antioxidante en el semen porcino asociado a un nivel de 5 cm de vapor de nitrógeno, beneficia la calidad espermática en el proceso de congelación.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CERDO**

Desde tiempos prehistóricos el ser humano empezó a consumir carne de los diferentes tipos de animales que conseguía al cazar, entre ellos se encontraba el cerdo, la evidencia arqueológica hallada, data de que hace unos 40 millones de años, que los cerdos fueron domesticados a partir de su ancestro, el jabalí (Ballina y Bencomo, 2010).

También, refieren que los cerdos, al igual que los jabalíes, sus ancestros, obtenían su comida del bosque entre raíces e insectos, pero a medida que se extendía la población los cerdos se quedaban sin territorio para su alimentación, lo que hizo que los ganaderos, los confinaran y así agregar en la dieta lo que son verduras y desechos de mesa.

### **2.2. CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA DEL CERDO**

Huayhua (2005), hace referencia a Vieites (1997), el cual ratifica que el cerdo tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	Animal
Tipo	Cordados
Subtipo	Vertebrados
Clase	Mamíferos
Orden	Ungulados
Suborden	Artiodáctilos
Familia	Suideos
Subfamilia	Suinos
Generó	Sus
Especie	Sus vita tus, Sus scrofa, Sus mediterraneus

### **2.3. ANDROLOGÍA PORCINA**

Rodríguez (2013), argumenta que al realizar un examen andrológico específico donde se deben tener en cuenta diferentes factores como la raza, edad, nivel nutricional, manejo, interacción social, factores ambientales, enfermedades intercurrentes etc, ya que estos factores pueden afectar la fertilidad y la

productividad; y que todo esto está relacionado a el estado de salud general que se encuentre el cerdo y específicamente las funciones del sistema endocrino y así mismo de sus órganos genitales (testículos, tracto genital, glándulas accesorias).

Además, argumenta que para la selección del reproductor es indispensable que el verraco cumpla algunos lineamientos de evaluación, lo que influirá directamente en desempeño reproductivo y en el porcentaje de fertilidad, los órganos sexuales masculinos, compuestos por un conjunto de segmentos ubicados uno a continuación del otro, los cuales son encargados de la formación, maduración, transporte y trasmisión de las células germinales y de las células del semen, se clasifican en genitales primarios y genitales secundarios.

## **2.4. ÓRGANOS SEXUALES PRIMARIOS**

### **2.4.1. TESTÍCULOS**

Los testículos son dos glándulas las cuales están adheridas de forma vertical al tren posterior, en su mayoría están conformados por los túbulos seminíferos los que se asemejan a una red intrincada de conductos en los que se producen los espermatozoides (esperma), ha este proceso de denomina espermatogénesis, también elaboran la hormona de la testosterona, ya que esta hormona es la encargada de determinar el desarrollo, mantener las reacciones sexuales del macho y de los caracteres sexuales secundarios (Williams, 2013).

### **2.4.2. ESCROTO**

Machuca y Pérez (2018), consideran que el escroto, es un saco cutáneo con forma, tamaño y situación anatómica se adapta a la forma del testículo, el escroto consta de una piel fina, pagable y sin pelo, bajo la capa cutánea externa se localiza un tejido fibroelástico, llamado túnica de dartos; el cual se encarga de regular la temperatura pasando anatómicamente por en medio de los testículos, de forma que el saco escrotal está dividido en dos partes, uno para cada glándula; se ubica suspendido inguinal, con forma ovoide, alargada y pendular, su función principal es la de brindar protección a los testículos y de regular la temperatura.

## **2.5. ÓRGANOS SEXUALES SECUNDARIOS**

### **2.5.1. EPIDÍDIMO**

Inatec (2018), refiere, que el epidídimo es la estructura adyacente al testículo, que cumple las funciones de transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides, anatómicamente se reconocen tres partes del mismo: cabeza, cuerpo y cola; la cola continua con los conductos eferentes que transportan y almacenan el semen hacia la uretra durante el proceso de la eyaculación.

Machuca y Pérez (2018), plantean, que los espermatozoides al momento de abandonar el testículo son inmaduros, por lo que es necesario que pasen por un periodo de maduración por el epidídimo, para así tener la capacidad de fecundación.

### **2.5.2. CONDUCTO DEFERENTE**

Es un tubo muscular que al momento de la eyaculación expulsa a los espermatozoides al exterior desde el epidídimo hacia el conducto eyaculador; el conducto deferente empieza desde la cola del epidídimo, atraviesa por el conducto inguinal que parte desde el cordón espermático y el anillo inguinal interno, con dirección caudal separado de los vasos y nervios (Machuca y Pérez, 2018).

### **2.5.3. VESÍCULAS SEMINALES**

De acuerdo con Williams (2013), las vesículas seminales, son órganos pares ubicados lateralmente en la parte terminal de cada conducto deferente, en el verraco son relativamente difusas, grandes y lobuladas, las vesículas son las encargadas del mayor volumen del líquido en el plasma seminal, así mismo secretan altos niveles de fructosa y ácido cítrico como la ergotionina, inositol, diversos aminoácidos y glicerylforylcolina, los que son utilizados como sustratos de energía por los espermatozoides eyaculados.

### **2.5.4. PRÓSTATA**

La próstata es una pequeña protuberancia transversal en forma de anillo que rodea la uretra en la parte superior, está ubicada al lado de las glándulas vesiculares, se encuentra incrustada en su mayoría en la capa muscular que rodea a la uretra, durante la eyaculación las glándulas de la próstata segregan

sustancias alcalinas que contienen calcio y fosfatasa ácida, estas secreciones cumplen la función de neutralizar las secreciones ácidas propias de la vagina, así también se pensaba que la próstata se encargaba de darle el característico olor al semen (Williams, 2013).

### **2.5.5. PENE**

El pene cumple dos funciones: la expulsión del semen al momento de la cópula y la expulsión de la orina Inatec (2018). Especifica además, que en el cerdo el pene es fibro-elástico los cuerpos cavernosos son menos desarrollados, poseen la flexura sigmoidea o “S” peneana, la cual se distiende por la relajación de los músculos retractores del pene durante la erección y regresa a su posición de descanso por la concentración de los músculos retractores, en el cerdo no tiene una estructura que se diferencie del cuerpo del pene, el glande en si es una continuación que termina en forma de tirabuzón o sacacorchos.

### **2.5.6. PREPUCIO**

En el cerdo el prepucio es más largo que la parte libre en la que se aloja el pene, en la cavidad prepucial situado en un orificio estrecho por el cual se accede al divertículo prepucial, lo que forman dos amplias cavidades donde se almacena una sustancia de un olor pestilente, la que resulta de la mezcla de secreciones cutáneas en descomposición y orina, la que sirve de lubricante para el pene antes de la cópula (Gil *et al.*, 2018).

Inatec (2018), afirma que el prepucio es la capa de la piel que cubre el pene flácido, forma un saco donde se almacena fluidos muy ricos en feromonas y con una elevada contaminación bacteriana a las que se denominan secreciones prepuciales.

## **2.6. CARACTERÍSTICAS DE LA RAZA YORKSHIRE**

### **2.6.1.1. APARIENCIA GENERAL**

### **2.6.2. YORKSHIRE**

En 1981 Valdez declara que la raza Yorkshire se originó a final del siglo XVIII, surge del cruzamiento de cerdos de gran Bretaña, donde el resultado de esta cruce se le agrego cerdos como los Leicestershire, siameses y chinos, teniendo un gran éxito en los criaderos europeos e ingleses, de acuerdo a muchos autores

actualmente existen tres variedades del cerdo Yorkshire; una de sus ventajas de esta raza es su capacidad maternal con una magnífica calidad de desarrollo corporal, el Yorkshire es un animal blanco rosado, de piel fina y mucosas despigmentadas (Chuquitarco, 2012).

## **2.7. PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA**

Los espermatozoides procedentes del epidídimo con el plasma seminal, el semen es una suspensión celular semigelatinosa que resulta de la mezcla de secreciones de las glándulas genitales masculinas y de la secreción testicular al momento de la eyaculación, el semen porcino se caracteriza por el volumen ya que tiene mayor material gelatinoso y un extenso período de eyaculación heterogénea por la composición del plasma y células espermáticas; la cantidad total de semen es de 15,000 — 50,000 (Salazar, 2014).

## **2.8. EYACULADO Y SUS FRACCIONES**

### **2.8.1. FRACCIÓN PRE ESPERMÁTICA**

La fracción pre espermática caracterizada por tener alto contenido bacteriano, es transparente sin espermatozoides tiene un volumen de 10 a 15 mL y está constituida por las glándulas accesorias como la próstata, glándulas de Cowper y vesículas seminales, por lo tanto esta fracción no es necesaria (Intriago y Vargas, 2019).

### **2.8.2. FRACCIÓN ESPERMÁTICA O RICA EN ESPERMATOZOIDES**

Volumen entre 50 — 150 mL color blanco lechoso, tomando en cuenta que estos factores influyen en la producción espermática como: edad, nutrición, raza, etc. Esta fracción rica en espermatozoides está compuesta por secreciones de la próstata y de las vesículas seminales (Salazar, 2014).

### **2.8.3. FRACCIÓN POST ESPERMÁTICA**

Fracción post espermática o también conocida como fracción pobre en espermatozoide es de color blanquecino transparente con un aproximado de volumen 200 mL contiene grumos gelatinosos que vienen constituidos de las secreciones de la próstata y glándulas de cowper (Caiza, 2009).

## **2.9. CALIDAD SEMINAL**

Salazar (2014), argumenta que el esperma es el resultado al momento de la eyaculación de una mezcla de espermatozoides que es una célula terminal que tiene como función el transporte, constituido por el centriolo y el genoma nuclear, objetivo llegar al ovocito, para ejercer esta función el semen tiene que poseer estructuras especializadas como: membrana plasmática, organelos que especifican la vaina mitocondrial, flagelo y el acrosomal; estos garantizan la interacción del tracto genital femenino y el ovocito y sus envolturas.

## **2.10. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA**

### **2.10.1. VOLUMEN**

Según el reporte de Intriago y Vargas (2019), refiere que el volumen del semen es de 50 a 150 mL esto va a depender de la raza, tamaño testicular, edad y estado fisiológico del animal, mientras que el eyaculado es de 250 mL alrededor.

### **2.10.2. COLOR**

León (2006), publica que el color blanco cremoso o blanco lechoso, puede variar, con una apariencia opaca lo que nos manifiesta una alta concentración de espermatozoides.

### **2.10.3. OLOR**

El semen del cerdo se caracteriza por tener una ligera afectación por las feromonas del aparato genital, siendo su olor sui generis, en ocasiones el semen suele estar contaminado por orina o secreciones prepuciales, lo que ocasiona que tenga un olor muy fuerte (León, 2006).

### **2.10.4. pH**

El pH del eyaculado va a depender de lo que aporta las glándulas anexas, un eyaculado recién obtenido tiene valores desde 6,4 a 7,4 pero este valor puede variar por el tiempo, contaminación bacteriológica, manipulación y concentración (Intriago y Vargas, 2019).

## **2.11. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA**

Peñafiel (2018), en su investigación realizada redacta que para observar la calidad del semen se debe llevar a cabo un análisis cuantitativo laboratorial



donde se determinarán ciertas características espermáticas como: motilidad, vitalidad, concentración, aglutinación y morfología.

### **2.11.1. VITALIDAD**

Se realiza la evaluación del número de espermatozoides vivos, para esto se debe de teñir la muestra con eosina-nigrosina, un colorante que nos permitirá observar a los espermatozoides muertos con un tono rojo o rosa, mientras que a los espermatozoides vivos no tendrán ningún tipo de coloración, para procesar una muestra de semen su vitalidad debe de ser de un 80% con un 20% de mortalidad función atravesar la membrana de los espermatozoides muertos con facilidad, (Peñañiel, 2018).

### **2.11.2. MOTILIDAD**

La motilidad espermática es un parámetro el cual refleja la vitalidad del eyaculado, en función de la cantidad de células movibles en la muestra, por lo que se puede ver afectada por factores exógenos como excesivo calor, luz, frío, agentes químicos o extraños, para ello se tiene presente que exista un número de espermatozoides que no presenten movilidad al momento de la evaluación (Domínguez, 2018).

Es decir que tiene largo periodo de inactividad sexual se presenta una baja motilidad y alto número de espermatozoides muertos, donde su valoración se la realiza en el microscopio siendo esta la más económica forma observar la motilidad espermática; para esta clasificación se tiene unos parámetros a seguir donde de cero a cinco comprende desde los espermatozoides sin movimiento, hasta aquellos con movimientos sucesivo muy rápidos (Villa, 2020).

### **2.11.3. ANOMALÍAS ESPERMÁTICAS**

Las anomalías espermáticas representan cualquier modificación, malformación, defectos, mutación o disminución de la estructura natural del espermatozoide, que tiene como consecuencia afectaciones sobre el funcionamiento y/o fertilidad del esperma (Torretta *et al.*, 2010).

### **2.11.4. ENDOSMOSIS CELULAR**

La endosmosis celular se trata de la difusión de fuera adentro, que se establece al mismo tiempo que su contraria la exósmosis, cuando dos líquidos de distinta densidad están separados por una membrana semipermeable.

### **2.11.5. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA**

La morfología espermática es uno de los parámetros más importantes que se evalúan durante el análisis seminal. El análisis seminal está compuesto tanto por pruebas convencionales en las cuales se determina la cantidad y cualidades de los espermatozoides como por pruebas funcionales que evalúan las características fisiológicas y moleculares del espermatozoide (Iglesias *et al.*, 2019).

#### **2.11.5.1. ESCALA DE VIGOR ESPERMÁTICO DE ACUERDO A LA MOTILIDAD**

- 0 Inmóviles o muertos
- 1 Girando entre sí, sin movimiento sucesivo.
- 2 Movimientos anormales, en ocasiones progresivos.
- 3 Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
- 4 Con movimientos progresivo rápido
- 5 Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido (Veloz, 2017).

De acuerdo con Villa (2020), plantea en su investigación que en el verraco se evalúa la motilidad espermática individual para ello, se debe tener presente que la motilidad va a depender de la temperatura de la muestra, la que tiene que ser de 37°C, por lo que la valoración debe ser rápida para evitar el enfriamiento de la muestra, ya que la valoración de la motilidad permite excluir los eyaculados con baja viabilidad, que tiene como un rango no recomendable utilizar un eyaculado < 50% de motilidad.

Un grupo de científicos han debatido sobre uno de los primeros descubrimientos más relevante y longevo de la historia, la cual data desde 1677, cuando Antón van Leeuwenhoek miró a través de su microscopio su propio semen, al hacerlo se convirtió en la primera persona en observar las células reproductoras, a las que denominó animáculos, los cuales tenían movimiento de serpiente o de una anguila nadando (Cara, 2020).

El mismo autor redacta que actualmente los científicos aseveran que los espermatozoides no se mueven simplemente moviendo sus colas de un lado para el otro como se conocía, si no que los espermatozoides realizan un complejo bailoteo en tres dimensiones de rotación y giro lo que hace una ilusión óptica que pareciera que agitan sus colas cuando son observados a través del microscopio tradicional.

#### **2.11.6. AGLUTINACIÓN**

Peñafiel (2018), refiere que este fenómeno se lo observa mayormente en los eyaculados frescos y en los recién diluidos donde se da mayor concentración de espermatozoides vivos o muertos, los cuales están unidos a las células epiteliales o unidos entre sí, la aglutinación se puede dar por diferentes factores como; presencia de gran cantidad de células epiteliales, mala calidad espermática, contaminación del eyaculado y alteración del pH en plasma seminal, las que se asocian a procesos inflamatorios o alteraciones en las glándulas accesorias.

#### **2.11.7. CONCENTRACIÓN**

Según Peñafiel (2018), asevera que la concentración es un parámetro importante en la evaluación espermática, por ello se la expresa con el número de espermatozoides por mL, para poder determinar la concentración espermática del eyaculado se la realiza con una cámara de Burker o una cámara de Neubauer con el semen diluido, por lo que debe haber una concentración de espermatozoides de unos 4.000M lo que haría una dosis seminal de unos 100mL.

Salazar (2014), reporta que la concentración es un parámetro fundamental para la determinación del número de espermatozoides, ya que de esta forma se puede determinar el volumen del eyaculado para así determinar la cantidad de dosis seminales.

### **2.12. ENVEJECIMIENTO CELULAR**

En 1956 el Dr. Denhan Harman de la universidad de Nebraska fue el primer investigador en referirse que los radicales libres causan el envejecimiento celular, ya que se caracteriza por la disminución de funciones fisiológicas, esto

lleva a la morbilidad y muerte, este proceso es controlado por una combinación de factores ambientales y genéticos (Criado y Moya, 2009).

También, pública que en condiciones normales existe un equilibrio en los radicales libres y neutralización de los sistemas de defensas antioxidantes, pero la sobreproducción de radicales libres y deficiencia de los sistemas de antioxidantes produce el estrés oxidativo y daña la célula.

### **2.13. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo en los espermatozoides, se refiere al daño que estos puedan sufrir en su integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos, lo que tiene un efecto relacionado con la disminución en su capacidad fecundante posterior a la eyaculación, que forman grandes cantidades de especies reactivas al oxígeno, lo que ocasiona el estrés oxidativo (Córdova *et al.*, 2009).

La producción de semen porcino se caracteriza por su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que se pueden oxidar fácilmente, que requiere de antioxidante que sea eficaz, las alteraciones en el semen determinan el estrés oxidativo asociado con la producción excesiva de (ROS); esto altera la integridad del ADN del semen y limita la fertilidad de las células, deja como consecuencia un daño en las proteínas y lípidos de su membrana plasmática (Hernández *et al.*, 2015).

La sensibilidad del semen al estrés oxidativo pero tiene un sistema antioxidante en el plasma seminal e intracelular, estos están agrupados para neutralizar los efectos tóxicos de los reactivos de oxígeno (ROS); a lo largo de la fase de enfriamiento en la congelación y pos descongelación, disminuye la concentración de la enzima llamada dismutasa (SOD), deja expuestos los espermatozoides a la acción de los radicales libres (Flores *et al.*, 2018).

Los mismos autores refieren, que la preservación de semen porcino es limitada ya que los espermatozoides de esta especie son especialmente sensibles a temperaturas menores a 15°C, las cuales generan daños en la membrana plasmática y en el acrosoma, que afecta la viabilidad y funcionalidad del semen; A estos efectos se han relacionado con la producción excesiva de Radicales

Libres (RL) en el espermatozoo, lo que en altas concentraciones generan estrés oxidativo (EO) y ocasiona cambios celulares como la lipoperoxidación de la membrana plasmática.

Finalmente destaca que la situación a la que el espermatozoide es particularmente susceptible, debido a los ácidos grasos polinsaturados en la membrana plasmática que se encuentran en altas concentraciones, así como los espermatozoides son sensibles al estrés oxidativo, así mismo cuentan con un sistema antioxidante en el plasma seminal e intracelular, los cuales están armónicamente acoplados para contrarrestar los efectos tóxicos de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) dentro del sistema antioxidante enzimático del semen destaca la Superóxido Dismutasa (SOD).

## **2.14. CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA**

Williams et al (2015), plantean que el semen porcino es apto al daño peroxidativo provocado por el proceso de criopreservación, esto se da por la proporción de ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en sus membranas; la calidad en que los espermatozoides pierden movilidad in vitro se relaciona con la tasa de Peroxidación lipídica que estos sufren; los antioxidantes son sustancias que muchas veces se encuentran presentes en bajas concentraciones con respecto a los sustratos oxidables estos retrasan o eliminan la oxidación de dicho sustrato.

El semen porcino es sensible al frío cuando es sometido a temperaturas bajas 15°C lo que causa daños en su membrana plasmática y acrosómica a consecuencia del estrés oxidativo por la formación de cristales de hielo; en la crioconservación los daños son mayores ya que deteriora el citoesqueleto, perjudica el ADN e incrementa la oxidación celular, produce pérdidas de enzimas, todas estas alteraciones afectan la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática (Sánchez, 2007).

Además, ratifica que en el año de 1949 se inicia la congelación de espermatozoides de una forma experimental y de una manera preventiva, los mismos que serían usados más tarde en inseminación artificial (IA), en el mismo año Polge y colaboradores realizaron prácticas con espermatozoides de toros dando muy buenos resultados, en cuanto a la resistencia al frío lo que ayudó a

la obtención de parto en vacas inseminadas artificialmente con semen descongelado, lo que hizo que se difundiera rápidamente esta técnica de mejora en la producción.

En una investigación realizada por Carpio *et al.* (2008) reportan, que en este trabajo, para la congelación del semen se usaron dos métodos de congelación: primer método fue la congelación de semen en pajillas: donde se equilibraba el semen por 2 horas a 5°C, luego se procede a vaciar el semen en las pajillas de 0.5 ml, sellándolas con alcohol poli vinílico; las cuales se colocaron sobre una bandeja de rejillas, la cual fue puesta a 7cm de la superficie del nitrógeno líquido, en una caja de Tecnopor de 25 de largo, 20 de ancho y por 15 de alto.

También reportan, que una vez que sellaron completamente y se conservó durante 10min, para que el vapor de nitrógeno enfriara y congelara las pajillas de semen, luego de los 10min fueron sumergidas en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento en las canastillas del tanque criogénico.

Finalmente concretan que el segundo método fue la congelación de semen en pallets: se usaron hoyuelo forzados de 0,25 ml con un bloque de hielo seco en la superficie, y así mismo como en el anterior proceso de congelación se llevó al semen aun punto de equilibrio de 5°C, donde en cada agujero se mantuvo por 2min lo que permitió que se congele el semen.

## **2.15. ANTIOXIDANTES**

Los antioxidantes se especifican como cualquier molécula que pueden evitar o prevenir la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, el cargo de los antioxidantes es de donar electrones, para así retardar el desarrollo de una reacción oxido-reducción en cadena, es decir que sacrifica su estructura molecular para eliminar daños en sustratos biológicos; los antioxidantes se clasifican en enzimáticos, no enzimáticos, liposolubles e hidrosolubles, esta clasificación va a depender de su mecanismo de acción y solubilidad en el agua (Cabello, 2015).

De igual forma corrobora, que como sistema protector y evitar el daño oxidativo están los tejidos y células, éstas logran mantener un equilibrio funcional en el

ambiente aeróbico, los antioxidantes se constituyen en niveles de protección: prevención, intercepción y reparación.

Por último, especifica que se encuentran los antioxidantes preventivos como primera línea de defensa (proteínas secuestradoras de metales) los que destruyen la formación de radicales libres, éstos tienen la capacidad de destruir la iniciación de cadena (urato, albúmina, vitamina C o ácido ascórbico) y así eliminar e incitar la finalización de la reacción en cadena (vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, carotenos, polifenoles, ubiquinol) y en las enzimas de reparación, éstas subsanan el daño y ayudan a reparar los tejidos (proteasas, enzimas reparadoras de ADN, fosfolipasas, transferasas).

## **2.16. COENZIMA Q10**

Conforme a Criado y Moya (2009) definen que la coenzima Q10 es un antioxidante liposoluble derivada de la dieta, que protege el ADN de los radicales libres e impide la peroxidación lipídica, se encuentra en todas las células del cuerpo, es sintetizado por el organismo a partir de tirosina, fenilalanina y acetil CoA, está presente en todas las membranas celulares en especial en la mitocondria, participa en la cadena de respiración aeróbica; al mismo tiempo produce anticuerpos.

La coenzima Q10 es una molécula que se encuentra en todas las células del cuerpo pero de manera reducida (ubiquinol) u oxidada (ubiquinona); de manera principal se presenta en las células de las mitocondrias, estas son las que se encargan de innovar la energía de los nutrientes absorbidos en moléculas energéticas adenosina trifosfato (ATP), estas deben cumplir con sus funciones necesarias para las células (Tello, 2016).

De la misma manera reporta en su blog, que la coenzima Q10 en dosis adecuadas es necesarias dentro de las mitocondrias, ya que participan directamente en la generación de ATP y otra de sus funciones es que como moléculas bioenergéticas protege la célula del estrés oxidativo causado por ROS, estas dañan las estructuras y moléculas que son importantes para la célula como la bicapa lipídica y el ADN.

Dicha coenzima participa en la regulación de redox, se encuentra en la cadena de transporte de electrones, protege la célula del daño oxidativo que puede ocasionar agentes intrínsecos o extrínsecos, también es el encargado de cuidar la célula de la membrana plasmática, las lisosomas y el retículo endoplasmático; todas estas membranas tienen elementos que protegen la célula (Intriago y Vargas, 2019).

También refieren, que otro de los roles de la coenzima Q10 es de antioxidante en las membranas y lipoproteínas plasmáticas, pues estas reaccionan directamente frente a radicales de oxígenos, lipoperóxidos previene el daño que esta les causa a las moléculas en tejidos y células; de manera indirecta otros antioxidantes como la vitamina E y C considerados como primer antioxidante lipofílico endógeno sintetizado en los organismos vivos.

De igual manera, argumentan respecto a la adición de la coenzima Q10 como antioxidante en el semen porcino, en su investigación ejecutada, que luego de realizada la colecta seminal del verraco, se prepararon 21 muestras con 50 mL distribuidas en 3 tratamientos con diluyente de Beltsville Thawing Solution (BTS) para la adición de la coenzima Q10 en concentraciones de 0,02 mg/ml; 0,04 mg/ml; 0,06 mg/ml.

Finalmente concluyen que los mejores resultados obtenidos fueron 0,04 mg/ml y 0,06/mg/ml ya que la coenzima Q10 como antioxidante en la refrigeración del semen porcino no tiene efectos negativos sobre las células espermáticas, esto permite ampliar el tiempo de preservación, el semen diluido con coenzima Q10 no se evidenció anomalías en los rangos requeridos por esta investigación realizada, en cuanto a motilidad, normalidad y vitalidad; esto convierte esta exploración en una alternativa favorable para la reproducción porcina, puesto que no afecta la calidad del semen refrigerado.



## CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

### 3.1. UBICACIÓN

#### 3.1.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

La siguiente investigación se realizará en los predios de la Unidad de Docencia Investigación y Vinculación (UDIV) Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM-MFL) en el sitio El Limón, cantón Bolívar, situado geográficamente entre las coordenadas 0° 49' 23" latitud sur; 80° 11' 01" longitud oeste y una altitud de 15 msnm.

**Imagen 3.1.** Ubicación satelital de la ubicación de la unidad de docencia e investigación y vinculación Hato Porcino ESPAM MFL



FUENTE: Google maps (2022)

#### 3.1.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS

Las características climáticas del sitio El Limón, de la parroquia Calceta ubicada en el cantón Bolívar de la Provincia de Manabí son:

Cuadro 3.1. Características climáticas

<b>Variables</b>	<b>Valor</b>
Precipitación media anual	996,7 mm
Temperatura media anual	26,05 °C
Humedad relativa anual	81,40%
Heliofanía anual	1109,80 Horas/sol
Evaporación anual	1256,30 mm

**FUENTE:** Estación Meteorológica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" (2019).

## **3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS**

### **3.2.1. MÉTODOS**

Método inductivo: Se enfocó en comprobar la hipótesis planteada, sobre el mejor nivel de coenzima Q10 (0,04) al nivel de 5 cm de vapor de nitrógeno, y se espera obtener el mejor resultado en cuanto a la calidad espermática.

Método analítico: se empleó para el análisis de los efectos de los distintos niveles de coenzima Q10 y vapor de nitrógeno en la calidad espermática.

Método estadístico: se empleó el análisis de varianza, previamente se comprobaron los supuestos de normalidad de los datos (Prueba de Shapiro-wilks) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett). Las diferencias estadísticas registradas en los factores principales e interacciones contaron con las comparaciones de medias múltiples empleando la técnica de Tukey al nivel de significancia del 5%.

### **3.2.2. TÉCNICAS**

Técnica de medición: Mediante la temperatura en que se sometieron las pajillas a (5cm, 10cm y 15 cm) de vapor de nitrógeno. Técnica de observación: recolección de datos y con el microscopio de platina térmica.

## **3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO**

El trabajo de investigación de campo tuvo una duración de siete meses, arrancando el 21 de noviembre del 2021 al 28 de junio del 2022.

### 3.4. FACTORES DE ESTUDIO

Niveles de nitrógeno (5, 10, 15cm).

Coenzima Q10 (0,04 mg/ml y 0.06 mg/ml).

Semanas (4)

### 3.5. TRATAMIENTOS

Para la evaluación del semen del cerdo Yorkshire x Topping F1, se empleó la coenzima Q10 como antioxidante en el semen porcino y tres niveles de vapor de nitrógeno (5, 10,15 cm), fueron constituidos por BTS (diluyente de 3 días más la adición de 0,04 — 0,06mg/ml CoQ10). Los tratamientos para esta investigación son los siguientes:

Cuadro 3.2. Esquema de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
T1 D1N1	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,04mg) R1 Vapor de Nitrógeno 5 cm
T2 D1N2	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,04mg) R1 Vapor de Nitrógeno 10 cm
T3 D1N3	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,04mg) R1 Vapor de Nitrógeno 15 cm
T4 D2N1	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,06mg) R1 Vapor de Nitrógeno 5 cm
T5 D2N2	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,06mg) R1 Vapor de Nitrógeno 10 cm
T6 D2N3	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,06mg) R1 Vapor de Nitrógeno 15 cm

#### 3.5.1. ARREGLO DE TRATAMIENTOS

La investigación se organizó en un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con un arreglo de tratamientos bifactorial (2 x 3), en el que el factor A, es la coenzima Q10 (0,04 y 0,06mg/mL), el factor B, vapor de nitrógeno (5cm, 10cm, 15cm) y el criterio de bloqueo considerado fueron las semanas la extracción del semen (1, 2, 3, 4).

Se empleó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + A \times B \times C_{(ijk)} + A \times B_{(ij)} + B \times C_{(jk)} + A \times C_{(ik)} + \text{Bloque}_{(l)} + \varepsilon_{(ijkl)} \quad [3.1]$$

Donde:

$Y_{ijkl}$ : Observación  $l$ -ésimo del  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$ , la  $j$ -ésimo nivel del factor  $B$  y la  $k$ -ésimo nivel del factor  $C$ , en el  $l$ -ésimo bloque

$\mu$ : Media poblacional

$A_i$ : Factor del  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$  (Niveles de coenzima Q10)  $i = 0,04 - 0,06$  mg/ml

$B_j$ : Factor del  $j$ -ésimo nivel del factor  $B$  (Niveles de vapor de nitrógeno)  $j = 5\text{cm} - 10\text{cm} - 15\text{cm}$

$c_k$ : Factor del  $k$ -ésimo nivel factor  $C$  (Razas)  $k = \text{Pietrain y Yorkshire}$

$A \times B \times (ijk)$ : Efecto de la interacción de segundo orden del  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$  por el  $j$ -ésimo nivel del factor  $B$  y por el  $k$ -ésimo nivel del factor  $C$ .

$A \times (ij)$ : Efecto de la interacción de primer orden del  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$  y por el  $j$ -ésimo nivel del factor  $B$ .

$B \times (jk)$ : Efecto de la interacción de primer orden del  $j$ -ésimo nivel del factor  $B$  y por el  $k$ -ésimo nivel del factor  $C$ .

$A \times (ik)$ : Efecto de la interacción de primer orden del  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$  y por el  $k$ -ésimo nivel del factor  $C$

$\text{Bloque}_{(l)}$ : Efecto del  $l$ -ésimo bloque (semana)  $l = 1$  y  $2$

$(ijkl)$ : Efecto aleatorio o error experimental con media cero y varianza común.

### 3.6. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Cuadro 3.3. Esquema del ADEVA

Fuentes de variación	Grados de libertad
Tratamientos	5
Factor A coenzima Q10	1
Factor B vapor de nitrógeno	2
A x B	2
Error experimental	12
Total	17

### 3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se utilizó como unidad experimental el cerdo Yorksihre x Topping F1 durante cuatro semanas, evaluado en cada nivel de coenzima Q10 y los distintos niveles de vapor de nitrógeno por un total de 24 observaciones.

### 3.8. VARIABLES EN ESTUDIO

#### 3.8.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Vapor de nitrógeno

Coenzima Q10

Semanas (4)

#### 3.8.2. VARIABLE DEPENDIENTE

Vitalidad del semen (porcentaje)

Motilidad del semen (porcentaje)

Normalidad del semen (porcentaje)

Borde Apical Normal (NAR) (Estructura morfológica íntegras)

Gota citoplasmática (GCs) (Presencia de gota citoplasmática en espermatozoide).

Borde apical dañado (DAR) (Estructura morfológica dañada del borde apical).

Costo beneficio (dólares americanos).

### **3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La variabilidad de los datos observados como consecuencia del efecto de los factores fue evaluada a través del análisis de varianza, previamente se comprobó los supuestos de normalidad de los datos (Prueba de Shapiro-wilks) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett). Las diferencias estadísticas registradas en los factores principales e interacciones contaron con las comparaciones de medias múltiples empleando la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Se emplearon algunas técnicas de estadística descriptiva como la medida de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar, error estándar de la media, coeficiente de variación y valores máximos y mínimos). Los análisis anteriormente mencionados se efectuaron en el software estadístico InfoStat versión estudiantil (2017) (Balzarini *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos fueron tabulados y graficados con la finalidad de expresar el cumplimiento de los objetivos previstos en la investigación.

### **3.10. PROCEDIMIENTO**

Se seleccionó el varraco ya entrenado (dos años de edad) y se procedió a depilar (tijeras) los bellos prepuciales y desinfección (diglocutano de clorhexidina al 5% Hibimax® diluida con agua bidestilada) de la zona genital para proceder a la colecta seminal. Para este fin se empleó un envase plástico (BoarMatic®) con capacidad máxima de 500 mL y un embudo, al que se le colocaron dos capas de gasa estéril para filtrar los gránulos de tapioca.

El método aplicado fue el de la mano enguantada (guante de látex sin nitrilo) y dilución con el agua bidestilada, luego se evaluaron las características precursoras de la calidad espermática (volumen, olor, color, concentración, vitalidad, mortalidad). Para efectos de garantizar la calidad seminal, se procedió a tomar la primera fracción del eyaculado (10 ml) con una concentración de  $700 \times 10^6$ , desechando el residuo del eyaculado.

Olor: a través del sentido del olfato se procedió a detectar el olor sui generis del semen porcino, con base a lo descrito por (León, 2006).

Volumen: se midió con una balanza digital Camry ACS-30-JE31 a través del uso de una funda de dilución de colecta con el material seminal. El volumen también se midió en relación 1g — 1 ml del eyaculado, fue la forma como se determinó la cantidad empleada para el procedimiento.

Después se valoró la concentración espermática en la cámara de *Spermacue* (marca Minitube®) de procedencia Estados Unidos. Se realizó una dilución 1/100, para ello se colocó 1 mL de semen en 100 de solución salina, se utilizó

15 microlitros en micro cubeta de evaluación *Spermacue* que después se procedió al conteo de las células espermáticas.

$$\text{Espermatozoide/ml} = \frac{\text{partículas contadas} \times 1000 \times \text{volumen total seminal}}{\text{SC (mm}^2) \text{ PC (mm)} \times \text{FD}} \quad [3.2]$$

SC: superficie contada, PC: profundidad de la cámara, FD factor de dilución.

Vitalidad y mortalidad de los espermatozoides se utilizó colorante eosina — nigrosina, se realizó el frotis, se dejó secar por unos minutos, después se procedió a evaluar la muestra en el microscopio de platina térmica *scientific led* Q200A. En este proceso los espermatozoides teñidos de colorante se consideraron muertos y los no teñidos se denominaron vivos, para obtener el porcentaje se contaron 100 células dispersas en la placa y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Mortalidad} = \frac{\text{Espermatozoides Vivos} \times 100 \text{ Celulas espemáticas}}{100} \quad [3.3]$$

El siguiente paso fue el proceso de estabilización hasta los 5°C de temperatura, llenado de las pajillas o ecopajuelas de 0.50 ml luego otra evaluación posterior a la estabilización, de ahí se sometió a vapor de nitrógeno (5, 10, 15 cm). Una vez

que efectuados todos estos pasos, se repitió la evaluación espermática desde el inicio para verificar la calidad espermática.



## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. VITALIDAD DEL SEMEN

En el cuadro 4.1., se representan los resultados del análisis de varianza para la variable vitalidad del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.0001, inferior que 0.05, en consecuencia, existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos estudiados. El coeficiente de variación evidenciado es de 7.63.

Cuadro 1.1. ADEVA para variable vitalidad del semen (%)

F.V.	SC	gl	CM	F	CV	p-valor
Modelo	598.18	5	119.64	21.2	7.63	<0.0001
Tratamientos	598.18	5	119.64	21.2		<0.0001 **
Error	101.56	18	5.64			
Total	699.74	23				

En el cuadro 4.2., se dispone la prueba de Tukey al 5% de significancia, registrando cinco categorías estadísticas diferentes. En la categoría A se encuentra el tratamiento D2N1 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 5 cm de vapor de nitrógeno) con 40.63% de vitalidad del semen, fue el que superó a los demás tratamientos al considerar que registró el mejor promedio de vitalidad del semen.

La categoría B le corresponde al tratamiento D1N1 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 5 cm de vapor de nitrógeno) con el 33.75%, seguido por el tratamiento D2N2 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 10 cm de vapor de nitrógeno) con el 31.25% en la categoría BC. En la categoría CD aparece el tratamiento D1N2 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 10 cm de vapor de nitrógeno) y D2N3 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 15 cm de vapor de nitrógeno) con el 28.13 y 27.5% respectivamente. Finalmente, en la categoría D se encuentra el tratamiento D1N3 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 15 cm de vapor de nitrógeno) con el 25.63% de vitalidad del semen.

Cuadro 4.2. Prueba de Tukey al 5% de significancia para variable vitalidad del semen (%)

Tratamientos	Medias	n	EE	Categoría
D2N1	40.63	4	1.19	A
D1N1	33.75	4	1.19	B
D2N2	31.25	4	1.19	BC
D1N2	28.13	4	1.19	CD
D2N3	27.5	4	1.19	CD
D1N3	25.63	4	1.19	D

Tratamientos con letras iguales no difieren de acuerdo a Tukey al 5%

Cabe destacar que a pesar de que el D2N1 fue el tratamiento con mayor porcentaje de vitalidad, este resultado no llena las expectativas productivas por no conservar la totalidad del semen, y en caso de aplicarse a nivel comercial, se producirían pérdidas por el porcentaje de mortalidad del material espermático.

## 4.2. MORTALIDAD DEL SEMEN

En el cuadro 4.3., se detallan los resultados del análisis de varianza para la variable mortalidad del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.0001, inferior que 0.05, en consecuencia, existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados. El coeficiente de variación evidenciado es de 3.45.

Cuadro 4.3. ADEVA para variable mortalidad del semen (%)

F.V.	SC	gl	CM	F	CV	p-valor
Modelo	598.18	5	119.64	21.2	3.45	<0.0001
Tratamientos	598.18	5	119.64	21.2		<0.0001 **
Error	101.56	18	5.64			
Total	699.74	23				

NS: No hay diferencias entre los tratamientos. \*\*Hay diferencias altamente significativas.

En el cuadro 4.4., se expone la prueba de Tukey al 5% de significancia, registrando cinco categorías estadísticas diferentes. En la categoría A se encuentra el tratamiento D1N3 (diluyente+CoQ10 0,04mg+15 cm de vapor de nitrógeno) con el 74.38% de mortalidad del semen. En la categoría AB se halla el tratamiento D2N3 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 15 cm de vapor de nitrógeno) y tratamiento D1N2 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 10 cm de vapor de nitrógeno) con el 72.5 y 71.88% de mortalidad respectivamente. La categoría BC le corresponde al tratamiento D2N2 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 10 cm de vapor de nitrógeno)

con el 68.35%, seguido de la categoría C que es ocupada por el tratamiento D1N1 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 5 cm de vapor de nitrógeno) con el 66.25% y el tratamiento D2N1 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 5 cm de vapor de nitrógeno) que obtuvo la categoría D reportó el menor valor entre los tratamientos con el 59.38% de mortalidad del semen, éste resultado no llena las expectativas productivas por no conservar la totalidad del semen, y, en caso de aplicarse a nivel comercial, generará con respecto a la relación productivo y económico, por el porcentaje de mortalidad del material espermático.

Cuadro 4.4. Prueba de Tukey al 5% de significancia para variable mortalidad del semen (%)

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>EE</b>	<b>Categoría</b>
D1N3	74.38	4	1.19	A
D2N3	72.50	4	1.19	AB
D1N2	71.88	4	1.19	AB
D2N2	68.75	4	1.19	BC
D1N1	66.25	4	1.19	C
D2N1	59.38	4	1.19	D

Tratamientos con letras iguales no difieren de acuerdo a Tukey al 5%

## MOTILIDAD MASAL

En el cuadro 4.5., se evidencian los resultados del análisis de varianza para la variable motilidad masal del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.6691, superior que 0.05, en consecuencia, existen diferencias estadísticas no significativas entre los tratamientos evaluados. El coeficiente de variación registrado es de 0.64.

Cuadro 4.5. ADEVA para variable motilidad masal

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>CV</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	1,21	5	0,2417	0,6444	0.64	0,6691
Tratamientos	1,21	5	0,2417	0,6444		0,6691 <b>NS</b>
Error	6,75	18	0,3750			
Total	7,96	23				

NS: No hay diferencias entre los tratamientos.

## 4.3. BORDE APICAL NORMAL (NAR)

En el cuadro 4.6., se evidencian los resultados del análisis de varianza para la variable borde apical normal (NAR) del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.052, superior que 0.05, en consecuencia existen

diferencias estadísticas no significativas entre los tratamientos evaluados. El coeficiente de variación registrado es de 4.37.

Cuadro 4.6. ADEVA para variable borde apical normal (%)

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>CV</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	625	5	125	2.73	4.37	0.052
Tratamientos	625	5	125	2.73		0.052 <b>NS</b>
Error	825	18	45.83			
Total	1450	23				

NS: No hay diferencias entre los tratamientos.

#### **4.4. BORDE APICAL DAÑADO (DAR)**

En el cuadro 4.7., se describen los resultados del análisis de varianza para la variable borde apical dañado (DAR) del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.0001, inferior que 0.05, en consecuencia, existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados. El coeficiente de variación registrado es de 5.79.

Cuadro 4.7. ADEVA para variable borde apical dañado (%)

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>CV</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	1262.5	5	252.5	33.05	5.79	<0.0001
Tratamientos	1262.5	5	252.5	33.05		<0.0001**
Error	137.5	18	7.64			
Total	1400	23				

\*\*Hay diferencias altamente significativas.

En el cuadro 4.8., se observa lo reportado en la prueba de Tukey al 5% de significancia, en que se evidencian cinco categorías estadísticas diferentes. En la categoría A se encuentra el tratamiento D2N1 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 5 cm de vapor de nitrógeno) con el 30% del borde apical del semen dañado. La categoría B le corresponde al tratamiento D1N1 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 5 cm de vapor de nitrógeno) con el 21.25%, seguido por el tratamiento D2N2 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 10 cm de vapor de nitrógeno) con el 20%.

En la categoría C aparece el tratamiento D2N3 (diluyente+CoQ10 0,06mg+ 15 cm de vapor de nitrógeno) con el 13.75%, en la categoría CD está el tratamiento D1N2 (diluyente+CoQ10 0,04mg+ 10 cm de vapor de nitrógeno) con el 27.5%, y, finalmente, en la categoría D se encuentra el tratamiento D1N3

(diluyente+CoQ10 0,04mg+ 15 cm de vapor de nitrógeno) que superó a los demás tratamientos con el 7.5% del borde apical de semen dañado.

Cuadro 4.8. Prueba de Tukey al 5% de significancia para variable borde apical dañado (%)

Tratamientos	Medias	N	EE	Categoría
D2N1	30.00	4	1.38	A
D1N1	21.25	4	1.38	B
D2N2	20.00	4	1.38	B
D2N3	13.75	4	1.38	C
D1N2	12.50	4	1.38	CD
D1N3	7.50	4	1.38	D

Tratamientos con letras iguales no difieren de acuerdo a Tukey al 5%

No obstante de que el D1N3 fue el tratamiento con menor incidencia de borde apical dañado (7,50%), teniendo menor porcentaje entre los tratamientos, este resultado no llena las expectativas productivas por no conservar la totalidad del semen, y, en caso de utilizarse a nivel comercial, se trabajaría a pérdida, debido al porcentaje elevado de borde apical dañado del espermatozoide.

#### 4.5. GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL (GCS)

En el cuadro 4.9 se muestran los resultados del análisis de varianza para la variable gota citoplasmática proximal (GCS) del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.4339, superior que 0.05, en consecuencia, existen diferencias estadísticas no significativas entre los tratamientos evaluados. El coeficiente de variación registrado es de 0.57.

Cuadro 4.9. ADEVA para variable gota citoplasmática proximal (%)

F.V.	SC	gl	CM	F	CV	p-valor
Modelo	95.83	5	19.17	1.02	0.57	0.4339
Tratamientos	95.83	5	19.17	1.02		0.4339 <b>NS</b>
Error	337.5	18	18.75			
Total	433.33	23				

NS: No hay diferencias entre los tratamientos. \*\*Hay diferencias altamente significativas.

#### 4.6. GOTA CITOPLASMÁTICA DISTAL (ECD)

En el cuadro 4.10, se muestran los resultados del análisis de varianza para la variable gota citoplasmática distal (ECD) del semen en términos porcentuales. El p-valor registrado es de 0.0484, igual que 0.05. El coeficiente de variación registrado es de 8.82.

Cuadro 4.10. ADEVA para variable gota citoplasmática distal (%)

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>CV</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	233.33	5	46.67	2.8	8.82	0.0484
Tratamientos	233.33	5	46.67	2.8		0.0484 <b>NS</b>
Error	300	18	16.67			
Total	533.33	23				

NS: No hay diferencias entre los tratamientos. \*\*Hay diferencias altamente significativas.

#### 4.7. ANÁLISIS ECONÓMICO

En el cuadro 4.11 se establecen resultados para el análisis económico según la metodología costo-beneficio. De manera general se evidencia que todos los tratamientos generaron pérdidas económicas al analizar la producción de 1000 pajuelas por cada tratamiento. No obstante, la relación beneficio-costos con menor índice de pérdida fue alcanzada por el tratamiento D1N3 (diluyente+CoQ10 0,04mg + 15 cm de vapor de nitrógeno) con el -0.52, lo que significa que, por cada dólar invertido, se obtendrán 52 centavos de pérdida.

Cuadro 4.11. Análisis económico

	<b>TRATAMIENTOS</b>					
	T1 D1N1	T2 D1N2	T3 D1N3	T4 D2N1	T5 D2N2	T6 D2N3
<b>Rendimiento %</b>	337,50	281,30	256,30	406,30	312,50	275,00
<b>Beneficio bruto (\$)</b>	6750,00	5626,00	5126,00	8126,00	6250,00	5500,00
<b>Total costos que varían</b>	1575,00	1875,00	2175,00	1875,00	2175,00	2475,00
<b>Costos fijos</b>	7656,92	7656,92	7656,92	7656,92	7656,92	7656,92
<b>Beneficios netos</b>	-2481,92	-3905,92	-4705,92	-1405,92	-3581,92	-4631,92
<b>B/C</b>	-0,73	-0,59	-0,52	-0,85	-0,64	-0,54

#### 4.8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio evidenció diferencias altamente significativas entre los tratamientos estudiados para la variable vitalidad del semen. Estos datos difieren de los registrados por Intriago y Vargas (2019), quienes demostraron que no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) para la variable vitalidad en el estudio evaluación del efecto de la adicción de coenzima Q10, sobre las características espermáticas del semen porcino refrigerado, probablemente esto se debió a que en esa investigación solo se refrigeró las muestras de estudio, mientras que en la presente investigación se congeló el semen, que al momento de descongelarse provocó severos cambios estructurales que lesionaron la membrana celular.

Para la variable mortalidad del semen se evidenciaron diferencias estadísticas altamente significativas. El tratamiento con el menor porcentaje de mortalidad fue el D2N1 con el 59% empleando el diluyente BTS más la coenzima Q10 (0,06mg) y 5 cm de vapor de nitrógeno. Este alto porcentaje de mortalidad que se debe a las alteraciones estructurales y funcionales experimentadas por el semen durante los cambios de temperaturas post congelación y descongelación, representa un déficit en la conservación del material genético.

A pesar de las diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados, se comprueba que la aplicación de la coenzima Q10 junto con el vapor de nitrógeno no son viables en la práctica, por lo que su uso no es recomendado para crioconservación de semen porcino. Que a criterio de Jovičić *et al*, (2020) el porcentaje de mortalidad en condiciones de crioconservación no debe exeder el 20%.

Estos resultados, confirman lo expuesto por Pérez *et al*. (2019), quienes en su estudio comparación de dos métodos de criopreservación de semen porcino y efectos sobre la calidad seminal y evidenciaron una mortalidad superior al 50% en torno a los tratamientos estudiados. Los registros evidenciados por el presente estudio también confirman los resultados de Fraser *et al*. (2014) que determinan que la conservación con vapor de nitrógeno no es viable de manera convencional en la conservación de semen porcino y también, reportaron diferencias estadísticas altamente significativas para la variable borde apical normal.

A pesar de que el D1N3 fue el tratamiento con menor incidencia de borde apical dañado (7,50%) entre los tratamientos, este resultado no es prometedor por no conservar la totalidad del semen, ya que se encuentra dentro de límite del rango máximo esperado tal como reporta Jovičić *et al*, (2020) que refiere que el porcentaje máximo de borde apical dañado debe ser del 5-8% y en caso de aplicarse a nivel comercial, de seguro ocasionarán pérdidas por la inversión implícita con relación al porcentaje de borde apical dañado de los espermatozoides que disminuirían las ganancias. Por otra parte, éstos resultados

coinciden con los de Estrada *et al.* (2018) quienes identificaron daños en el borde apical tras la aplicación de diferentes métodos de crioconservación.

La variable motilidad masal no generó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados. Estos datos confirman los de Pérez *et al.* (2019), quienes advirtieron diferencias estadísticas no significativas entre los tratamientos de crioconservación evaluados.

En cuanto a la variable gota citoplasmática proximal y gota citoplasmática distal, el estudio mostró que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados. No obstante, el nivel de incidencia registrada en el semen, promedian entre 3 a 4% (GCP) y entre el 5 y 6% (GCD) para los tratamientos evaluados, valores que están dentro rango considerado permisible para el uso del semen porcino en programas de crioconservación de acuerdo con el criterio de Jovičić *et al.*, (2020). Es de destacar, que los porcentajes de esta variable encontrados en el presente trabajo son más altos que los identificados por Intriago y Intriago (2022), quienes determinaron porcentajes entre el 1.76 y 3.57% (GCP) y 0.14 — 0.43% (GCD).

En relación con el análisis económico de los tratamientos estudiados, se demostró que todos los tratamientos generaron pérdidas económicas al analizar la producción de mil pajuelas por cada tratamiento. Los resultados de la presente investigación coinciden con lo publicado por Fraser *et al.* (2014) quienes concluyeron, que la conservación con vapor de nitrógeno no es viable de manera convencional en la conservación de semen porcino.



## **CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. CONCLUSIONES**

Existen diferencias estadísticas altamente significativas entre las dosis efecto de la coenzima Q10 como antioxidante espermático en los distintos niveles de vapor de nitrógeno post congelación del semen porcino, sin embargo, ninguno de los tratamientos fue capaz de conservar el semen sin perder características fundamentales para su viabilidad.

El análisis de interacción de la aplicación de la coenzima Q10 con los distintos niveles de vapor de nitrógeno sobre la calidad espermática post congelación, evidenció que la aplicación de diluyente + CoQ10 0,06 mg + 5 cm de vapor de nitrógeno, generó un mayor porcentaje de vitalidad, menor porcentaje de mortalidad del semen y borde apical dañado, que el resto de tratamientos, pero, a pesar de constituirse en el tratamiento con resultados superiores, los porcentajes de vitalidad (41%) y mortalidad (59%) no garantizan el uso de la coenzima y la crioconservación con vapor de nitrógeno.

En términos económicos todos los tratamientos generaron pérdidas económicas al analizar la producción de 1000 pajuelas por cada tratamiento.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

Proponer a futuras generaciones que involucre el uso de la coenzima Q10 como antioxidante espermático en combinación con otros medios con características conservantes como la clara de huevo. De este modo se podría aportar con nuevos y eficientes protocolos de conservación de semen porcino.

Desarrollar en próximas investigaciones, estudios de protocolos con la coenzima Q10 en tanques especializados para la distribución uniforme y cronometrada de nitrógeno, de este modo se podría implementar protocolos comerciales de conservación de semen porcino en beneficio de los productores.

No se sugiere el uso de la coenzima Q10 como antioxidante espermático en combinación con los distintos niveles de vapor de nitrógeno. El desarrollo de estos protocolos debe integrar otros medios o insumos que aporten realmente en la conservación de semen porcino.

## BIBLIOGRAFÍA

- AACP. (Asociación Argentina Cabañeros de Porcinos). (2007). Razas Porcinas. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://acortar.link/0F15tG>.
- Ballina, G., Bencomo, A. (2010). Manejo sanitario eficiente de los cerdos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). <https://acortar.link/vTulb9>.
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M. (2010). InfoStat estudiantil software estadístico 2017. Universidad Nacional de Córdoba. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>
- Caiza, D. (2009). Manejo de verracos para la obtención y procesamiento de semen porcino e inseminación artificial. Universidad Politécnica Nacional. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1667/1/CD-1959.pdf>
- Cabello, C. (2015). Efectos de la administración de vitaminas antioxidantes en las características seminales y estado oxidativo del carnero. [Tesis para obtener el título de médico veterinario, Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/143061>
- Cara, E. (2020). El famoso movimiento de los espermatozoides es una ilusión óptica, esto es lo que hacen en realidad. 19 sep 2020, de Gizmodo en español Sitio web: <https://acortar.link/VphgPk>.
- Carpio, M., Cadillo, J., Mellisho. (2008). Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 19(1), 15-19. <https://acortar.link/nhPxRI>
- Chuquitarco, M. (2012). Evaluación de la producción y calidad seminal en sementales porcinos del Establecimiento Provincial de Inseminación Artificial, Granma. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Córdoba, A., Ruiz, C., Córdoba, C., Córdoba, M., Guerra, J., Rodríguez, B., Arancibia, K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 3(1): 01-38. <https://acortar.link/RVRdgy>.
- Criado, C., Moya, M. (2009). Vitaminas y Antioxidantes. <https://acortar.link/Gd7CyS>.
- Cuenca, M., Avellaneda, J., (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 18, núm. pp. 1-11 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009012>
- Domínguez, R. (2018). Estrategias para reducir el estrés calórico y su efecto sobre características seminales en verracos jóvenes. Tesis para obtención del título de Ingeniero Zootecnista. <https://core.ac.uk/download/pdf/162862507.pdf>

- Estrada, E., Rodríguez, J., Yeste, M. (2018). Modulación de criotolerancia y su efecto en la fertilidad del semen porcino. *Avances de la Investigación Sobre Producción Animal y Seguridad Alimentaria en México*, 2(3), 1327.
- Flores, C. Meléndez, C. Mendoza, C. Márquez, Y. Vilanova, L. (2018). Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Rev. Vet*, vol. 29 núm. (1): 13-17. Doi: <http://dx.doi.org/10.30972/vet.2912780>.
- Fraser, L., Strzeżek, J., Kordan, W. (2014). Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Animal reproduction science*, 147(3-4), 119-127.
- García, E., Serrano, B., Álvarez, J. 2018. Efecto de la suplementación con harina de linaza sobre la calidad espermática en verracos *pietrain* resistentes o portadores del gen halotano. *Revista Científica*, 28(1)
- Gélvez, L. (2020). Cerdos Yorkshire. *Mundo Pecuario*. <https://acortar.link/2dS48j>.
- Gil, F., Ramírez, G., Ayala, D., López, O., Latorre, R., Martínez, F., Sánchez, C., Arencibia, A., Orenes, M., Vázquez, J. (2018). Anatomía interactiva del cerdo. *Anatomía y Embriología Veterinarias*. Universidad de Murcia, España <https://acortar.link/xuYV5N>.
- Guachún, M. H. (2017). Efecto del extracto del Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) en la congelabilidad del semen porcino. Universidad de Cuenca <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26268>
- Hernández, A. Hernández, A. Barrientos, M. Cervantes, P. Domínguez, P. Absalón, V. (2015). Actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-PX) del plasma seminal del cerdo. Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. AICA 6 (2015) 98-11
- Huayhua, R. (2005). Evaluación de tres niveles de adición de la mezcla enzimática “vegpro” en raciones para cerdos de engorde. 10 septiembre 2020, de Universidad Mayor de San Andrés facultad de Agronomía Sitio web: <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/7205>
- Iglesias, A., Guevara, J., López, O., Guerra, J., Huerta, R., Sánchez, R., Córdova, A. 2019. Evaluación de la técnica modificada de tinción Giemsa en la valoración acrosomal de espermatozoides de mamíferos. *Abanico veterinario*, 9.
- Inatec. (2018). Instituto Nacional Tecnológico. Manejo productivo y reproductivo en porcinos y aves. Nivel de formación y especialidad técnico general agropecuario. *Inatecsegundaedición*. <https://acortar.link/pouQ0d>.
- Intriago, J., Intriago, Y. (2022). Efecto antioxidante del aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) en el proceso de refrigeración del semen porcino en parámetros de calidad espermática. *ESPAM MFL*.

- Intriago, J., Vargas, M. (2019). Efecto de la coenzima Q10 como antioxidante sobre las características espermáticas del semen fresco porcino. [Informe de trabajo de titulación previa la obtención del título de médico veterinario, Escuela Superior Politécnica de Manabí] Repositorio Institucional UN. <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1147>
- Jovičić, M., Chmelíková, E., & Sedmíková, M. (2020). Cryopreservation of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*, 65(4), 115-123.
- León, C. (2006). Producción animal porcinos semen porcino diluyente espermatozoide. 28 de Agosto del 2020, de Escuela Politécnica Nacional Sitio web: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
- Machuca, C., Pérez, P. (2018). Anatomía y Fisiología Animal: 16 de Marzo del 2020. <https://acortar.link/3TueZP>
- Medina, V. Pérez, B. Cruz, P. (2008). Efecto de la incubación pos descongelación sobre la calidad de espermatozoides crioconservados de cerdo. *Revista Orinoquia*.12(2). <https://acortar.link/iGP2Br>.
- Membrillo, A., Córdova, A., Gómez, J., Valencia, J., Méndez, H. (2011). Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *REVISTA VETERINARIA*, 22(2). <http://dx.doi.org/10.30972/vet.2221827>
- Peñafiel, J. (2018). Calidad seminal en reproductores porcinos de la Granje Porkrib – Santa Elena. 27 de Agosto del 2020, de Universidad Técnica de Babahoyo.
- Pérez, M., Petrinelli, A., Rodríguez, P., Satorre, M., Breininger, E. (2019). Comparación de dos métodos de criopreservación de semen porcino. Efectos sobre la calidad seminal. *Revista veterinaria*, 30(1), 23-27.
- Restrepo, G. H. (2008). Efecto del antioxidante trolox sobre la integridad de membrana de espermatozoides porcinos congelados. [Tesis para obtener título de médico veterinario zootecnista, Universidad Nacional de Colombia] <http://ns3112306.ip-213-251-184.eu/handle/10946/1002>
- Rodríguez, D. (2012). Biotipos y raza. 3 agosto del 2020, de Universidad Agraria del Ecuador Sitio web: <https://acortar.link/400WqM>.
- Rodríguez, H. (2013). Evaluación de la calidad seminal en el verraco. División de reproducción comparada. *Revista veterinaria*, 5(2), 31-39.
- Rodríguez, M., Nivia, A. (2017). Efecto de la adición de antioxidantes sobre la motilidad espermática pos-criopreservación y fertilidad del semen de peces. *Revista veterinaria* 28(2); 157-164.
- Rugeles, C., Caicedo, R., Almentero, C., Linares, J., Vergara, O. (2013). Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. Nota técnica. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIII, Nº 3, 206 – 210.*

- Salazar, L. (2014). Evaluación del dipol como diluyente de recolección seminal y su efecto sobre la conservación y fertilidad de semen refrigerado de verraco (en línea). Escuela superior politécnica de Chimborazo.
- Sánchez, R. (2007). Congelación de semen en porcino. Historia y evolución. Consultado el 28 agosto del 2020, de 3tres3.com Sitio web: <https://acortar.link/AhWRRC>.
- Tello, J. 2016. Coenzima Q10 y calidad seminal. Clínica de fertilidad Procrear <https://procrear.com.pe/?s=coenzima+Q10>
- Toalombo, P., Paulina, A. (2012). Evaluación de la inseminación intrauterina profunda y cervical en cerdas (En línea). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Torretta, M; Rabaglino, M.; Ferrero, S. 2010. Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria, 11(12), 1-20.
- Veloz, D. (2017). Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial". Universidad de cuenca.
- Vieites, C. (1997). Producción porcina: Estrategias para una actividad sustentable. Buenos Aires-Argentina: Hemisferio Sur. 1(2), 506.
- Villa, P. (2020). Evaluación de semen porcino sometido a dilución en dos etapas térmicas y su efecto reproductivo sobre la inseminación artificial en cerdas. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Zootecnista (En línea). Consultado, 29 de ago. 2020. <https://acortar.link/5vc9wl>.
- Williams, S. (2013). Eficiencia reproductiva del verraco. Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte. 37(2), 200-206. <https://acortar.link/rYWAIt>
- Williams, S. (2017). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. Rev.Bras.Reprod.Anim.BeloHorizonte.37(2),207-212.<https://docplayer.es/49414178-Criopreservacion-de-semen-porcinosdesafios-y-perspectivas-swine-semen-cryoperservation-challenges-and-perspectives.html>
- Williams, S., Fernandez, V., Gavazza, M., Marmunti, M., Zeinsteger, P., Prenna, G. (2015). Congelación de semen porcino: Resultados y avances en la técnica. Rev. Analecta Vet. 35(1), 17-25.

# **ANEXOS**

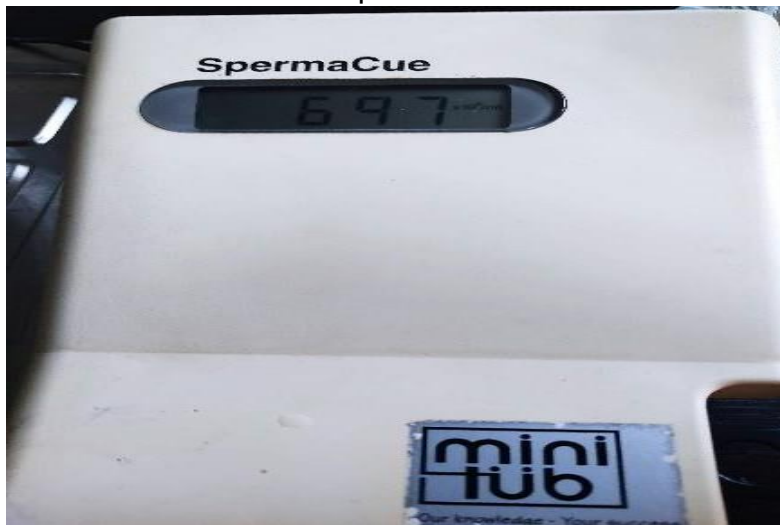
**Anexo N° 1:** Colecta de semen



**Anexo N° 2:** fracción del eyaculado



**Anexo N° 3:** Volumen espermático de la colecta

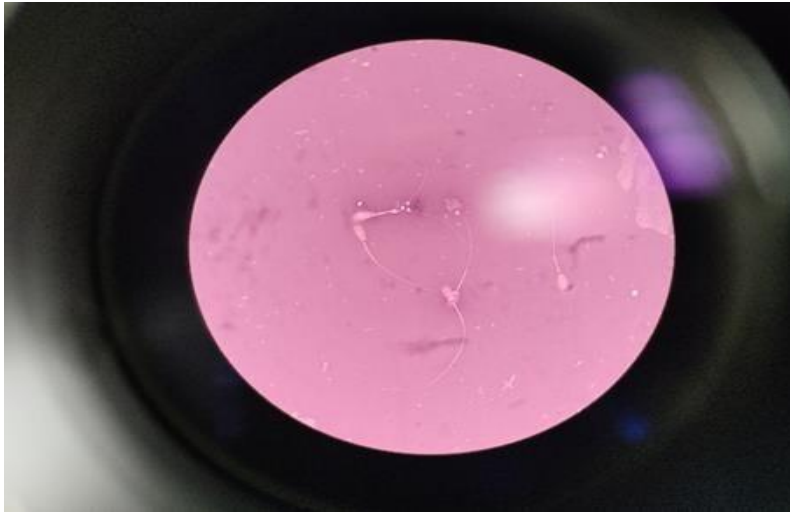




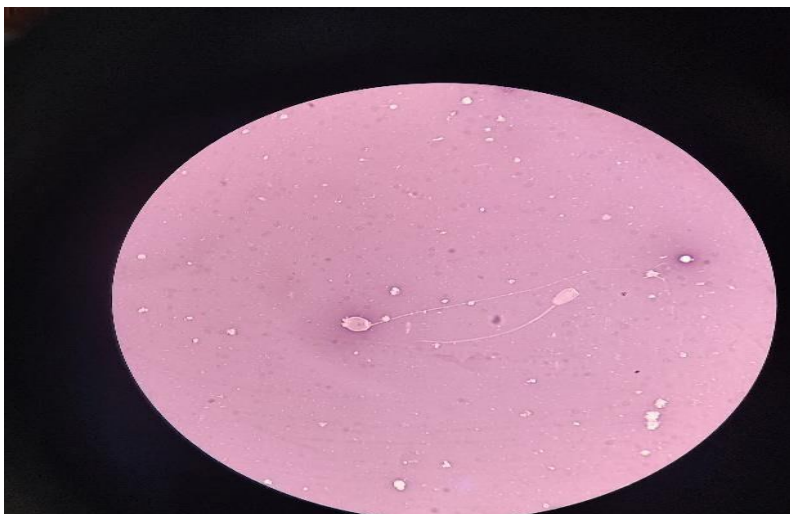
**Anexo Nº 4:** Observación de las variables a medir



**Anexo Nº 5:** Evaluación de la morfología espermática



**Anexo Nº 6:** Evaluación de la morfología espermática



### Anexo N° 7: Corrida estadística del software InfoStat para la variable vitalidad del semen

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Vitalidad (%)	24	0,85	0,81	7,63

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	598,18	5	119,64	21,20	<0,0001
tratamientos	598,18	5	119,64	21,20	<0,0001
Error	101,56	18	5,64		
Total	699,74	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,33795

Error: 5,6424 gl: 18

tratamientos	Medias	n	E.E.	
D1N3	25,63	4	1,19	A
D2N3	27,50	4	1,19	A B
D1N2	28,13	4	1,19	A B
D2N2	31,25	4	1,19	B C
D1N1	33,75	4	1,19	C
D2N1	40,63	4	1,19	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Anexo N° 8: Corrida estadística del software InfoStat para la variable mortalidad del semen

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Mortalidad (%)	24	0,85	0,81	3,45

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	598,18	5	119,64	21,20	<0,0001
tratamientos	598,18	5	119,64	21,20	<0,0001
Error	101,56	18	5,64		
Total	699,74	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,33795

Error: 5,6424 gl: 18

tratamientos	Medias	n	E.E.	
D2N1	59,38	4	1,19	A
D1N1	66,25	4	1,19	B
D2N2	68,75	4	1,19	B C
D1N2	71,88	4	1,19	C D
D2N3	72,50	4	1,19	C D
D1N3	74,38	4	1,19	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo N° 9:** Corrida estadística del software InfoStat para la variable motilidad masal

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Motilidadmasal	24	0,15	0,00	0,64

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,21	5	0,24	0,64	0,6691
tratamientos	1,21	5	0,24	0,64	0,6691
Error	6,75	18	0,38		
Total	7,96	23			

**Anexo N° 10:** Corrida estadística del software InfoStat para la variable borde apical normal

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Borde Apical Normal	24	0,43	0,27	4,37

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	625,00	5	125,00	2,73	0,0527
tratamientos	625,00	5	125,00	2,73	0,0527
Error	825,00	18	45,83		
Total	1450,00	23			

**Anexo N° 11:** Corrida estadística del software InfoStat para la variable borde apical dañado

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Borde Apical Dañado	24	0,90	0,87	5,79

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1262,50	5	252,50	33,05	<0,0001
tratamientos	1262,50	5	252,50	33,05	<0,0001
Error	137,50	18	7,64		
Total	1400,00	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,21096

Error: 7,6389 gl: 18

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
D1N3	7,50	4	1,38	A
D1N2	12,50	4	1,38	A B
D2N3	13,75	4	1,38	B
D2N2	20,00	4	1,38	C
D1N1	21,25	4	1,38	C
D2N1	30,00	4	1,38	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Anexo N° 12:** Corrida estadística del software InfoStat para la variable gota citoplasmática proximal

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Gota citoplasmática proxim..	24	0,22	4,8E-03	0,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	95,83	5	19,17	1,02	0,4339
tratamientos	95,83	5	19,17	1,02	0,4339
Error	337,50	18	18,75		
Total	433,33	23			

**Anexo N° 13:** Corrida estadística del software InfoStat para la variable gota citoplasmática distal

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Gota citoplasmática distal..	24	0,44	0,28	8,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	233,33	5	46,67	2,80	0,0484
tratamientos	233,33	5	46,67	2,80	0,0484
Error	300,00	18	16,67		
Total	533,33	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=9,17420

Error: 16,6667 gl: 18

tratamientos	Medias	n	E.E.
D2N1	10,00	4	2,04 A
D1N1	11,25	4	2,04 A
D1N3	12,50	4	2,04 A
D2N2	16,25	4	2,04 A
D1N2	16,25	4	2,04 A
D2N3	18,75	4	2,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Anexo N°14:** Presupuesto general para la producción de mil pajuelas de semen porcino

<b>Rubro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
<b>COSTOS DIRECTOS</b>				
<b>EQUIPOS</b>				
Termo criogénico	unidad	1	600	600
<b>Subtotal 1</b>				600
<b>INSUMOS</b>				
Agua destilada	l	1	58,34	58,34
Nitrógeno (3 meses)		1	240	240
Semen	unidad	6000	1	6000
<b>Subtotal 2</b>				6298,34
<b>MATERIALES</b>				
Cinta para medir pH	unidad	1	22	22
Cubre objetos	paquete x 100	1	5,5	5,5
Guantes	paquete	1	35	35
<b>Subtotal 3</b>				62,5
<i>Total de costos directos</i>				6960,84
<i>Depreciación de 10 ciclos</i>				
5% Costos de administración				348,04
5% Reposición de infraestructura				348,04
<i>Costos indirectos</i>				696,08
<b>T. Sumatoria de costos</b>				<b>7656,92</b>

**Anexo N° 15:** Costos variables para la producción de mil pajuelas de semen porcino

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN			Total
T1 D1N1	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,04mg)	R1	Vapor de Nitrógeno 5 cm	1575
T2 D1N2	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,04mg)	R1	Vapor de Nitrógeno 10 cm	1875
T3 D1N3	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,04mg)	R1	Vapor de Nitrógeno 15 cm	2175
T4 D2N1	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,06mg)	R1	Vapor de Nitrógeno 5 cm	1875
T5 D2N2	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,06mg)	R1	Vapor de Nitrógeno 10 cm	2175
T6 D2N3	BTS (diluyente de 3 días+CoQ10 0,06mg)	R1	Vapor de Nitrógeno 15 cm	2475