



Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Producción y Salud Animal

Evaluación del efecto de la Heparina, Cafeína y Bicarbonato de Sodio sobre la motilidad de las células espermáticas porcinas, contenidas en dosis de semen fresco refrigerado para inseminación artificial, en la Provincia de Moyobamba, Región San Martín-Perú.

Tesis presentada por:

Quintana Montalvo, Luis Angel

ORCID: 0000-0002-8001-1193

Para optar el Grado Académico de Maestro en Producción y Salud Animal

Asesora:

Dra. Picha Torres, Yessenia Liliana

ORCID: 0009-0000-5038-1997

Arequipa – Perú

2026

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 15 de Junio del 2026

Dictamen: 013079-C-EPG-2026

Visto el borrador del expediente 013079, presentado por:

2023004771 - QUINTANA MONTALVO LUIS ANGEL

Titulado:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HEPARINA, CAFEÍNA Y BICARBONATO DE SODIO SOBRE LA
MOTILIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS PORCINAS, CONTENIDAS EN DOSIS DE SEMEN
FRESCO REFRIGERADO PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, EN LA PROVINCIA DE
MOYOBAMBA, REGIÓN SAN MARTÍN-PERÚ.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**16423061 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO ALBERTO
DICTAMINADOR**



**29624016 - ROMAN COYLA VERONICA MARIANELLA
DICTAMINADOR**



**29520758 - VELAZCO GUTIERREZ RUBEN ROBERTO
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HEPARINA, CAFEÍNA Y BICARBONATO DE SODIO SOBRE LA MOTILIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS PORCINAS, CONTENIDAS EN DOSIS DE SEMEN FRESCO REFRIGERADO PARA INSEMINACIÓN ARTIFICI

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	2%
	Trabajo del estudiante	
2	repositorio.unjfsc.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
3	www.3tres3.com	1%
	Fuente de Internet	
4	magapor.com	1%
	Fuente de Internet	
5	dspace.espoch.edu.ec	1%
	Fuente de Internet	
6	www.gepork.es	1%
	Fuente de Internet	
7	repositorio.unjbg.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
8	desarrollo.us.to	1%
	Fuente de Internet	
9	porcino.info	1%
	Fuente de Internet	
10	www.researchgate.net	1%
	Fuente de Internet	

Excluir citas

Excluir bibliografía

Apagado

Apagado

Excluir coincidencias

< 1%

DEDICATORIA

A mis padres, **Custodio Quintana Guevara** y **María Emelina Montalvo Cabrera**, por ser el pilar más firme en mi vida. Gracias por su amor incondicional, sus sacrificios silenciosos y por enseñarme, con el ejemplo, que el esfuerzo y la perseverancia abren caminos donde antes solo había dudas. A mi esposa, **Cleotilde Cabrera Rodríguez**, por su paciencia, fortaleza y amor inquebrantable. Gracias por caminar conmigo incluso en los días más duros. Este logro también es tuyo, porque lo construimos juntos, paso a paso. A mis hijos, **Angel André Quintana Ocampo**, **Kotty Mikaela Quintana Cabrera** y **Luis Mathías Quintana Cabrera**, quienes son mi mayor orgullo y mi razón más profunda para seguir esforzándome. Todo lo logrado es también para ustedes, para que nunca se rindan y recuerden siempre que: "El éxito no es el final, el fracaso no es fatal; lo que cuenta es el valor para continuar." Sigán siempre sus propios sueños con absoluta pasión y valentía. A mis hermanas, **Lisbeth Vanessa Quintana Montalvo** y **Leslly Estefanía Quintana Montalvo**, por su apoyo incondicional, su cariño sincero y su presencia constante a lo largo de este camino. Con todo mi corazón,

Luis Angel Quintana Montalvo

AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi asesora de tesis, **Dra. Picha Torres Yessenia Liliana**, por su guía constante, sus valiosas observaciones y el compromiso demostrado durante todo el proceso de investigación. Su acompañamiento ha sido fundamental para lograr culminar este trabajo con éxito. Este trabajo fue realizado gracias al apoyo integral y facilidades brindadas por **Multigenética Porcina Kilo** y por el **Instituto de Educación Superior Tecnológico Público "Alto Mayo"**, instituciones que me brindaron la oportunidad, los recursos académicos y el espacio formativo necesarios para la ejecución y desarrollo de la fase experimental de esta investigación. Su compromiso con el avance científico y la excelencia en la producción animal han sido fundamentales para la culminación de este trabajo.*

A mis dictaminadores:

Dr. Fernández Fernández Fernando Alberto,

Dra. Román Coyla Verónica Marianella,

Dr. Velazco Gutiérrez Rubén Roberto

por sus observaciones rigurosas, sus correcciones oportunas y por haberme ayudado a identificar mis errores y mejorar este trabajo con profesionalismo y exigencia académica. Y a todas las personas que colaboraron, de una u otra manera, en la realización de esta tesis, les expreso mi más profundo agradecimiento. Sin ustedes, este logro no habría sido posible. Con profunda gratitud,

Luis Angel Quintana Montalvo

RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto de la heparina (0, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$), la cafeína (0, 2,5 y 5 mM) y el bicarbonato de sodio (0, 15 y 25 mM) sobre la motilidad y el vigor de las células espermáticas de semen porcino refrigerado, los días 4 al 8 postcolecta. Las evaluaciones microscópicas evidenciaron que, en ausencia de bicarbonato de sodio (0 mM), la motilidad espermática inicial (T_{15}) se mantuvo elevada en todos los tratamientos, con valores superiores al 82 %, sin diferencias significativas entre las concentraciones de heparina y cafeína ($p > 0,05$). No obstante, a los 60 minutos (T_{60}) se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos. Las combinaciones que incluyeron heparina (10 y 25 $\mu\text{g/mL}$), sin adición de cafeína ni bicarbonato, presentaron las mayores motilidades a T_{60} (≈ 80 %), siendo significativamente superiores al tratamiento control sin heparina (≈ 35 %; $p < 0,05$). Por el contrario, la adición de cafeína (2,5 y 5 mM) ocasionó una marcada reducción de la motilidad espermática a T_{60} , con valores inferiores al 4 %. Asimismo, los tratamientos suplementados con bicarbonato de sodio mostraron motilidades significativamente menores respecto de aquellos sin bicarbonato ($p < 0,05$). En relación con el vigor espermático, a los 15 minutos posteriores a la aplicación de los tratamientos, el 26,7 % de los espermatozoides se clasificó en la categoría A (alto vigor), mientras que el 48,1 % correspondió a la categoría D. Sin embargo, a los 60 minutos se observó una disminución considerable de la categoría A (5,6 %) y un incremento de la categoría D (78,9 %). En conclusión, los resultados sugieren que la suplementación con heparina podría contribuir a preservar la motilidad espermática en semen porcino refrigerado, mientras que la incorporación de cafeína y, especialmente, de bicarbonato de sodio, no resulta favorable bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Palabras clave: semen porcino refrigerado, motilidad espermática, vigor espermático.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of heparin (0, 10, and 25 µg/mL), caffeine (0, 2.5, and 5 mM), and sodium bicarbonate (0, 15, and 25 mM) on sperm motility and vigor in refrigerated boar semen from days 4 to 8 post-collection. Microscopic evaluations showed that, in the absence of sodium bicarbonate (0 mM), initial sperm motility (T_{15}) remained high in all treatments, with values above 82%, and no significant differences were observed among heparin and caffeine concentrations ($p > 0.05$). However, at 60 minutes (T_{60}), significant differences among treatments became evident. The combinations including heparin (10 and 25 µg/mL), without the addition of caffeine or bicarbonate, showed the highest motility values at T_{60} ($\approx 80\%$), being significantly higher than the control treatment without heparin ($\approx 35\%$; $p < 0.05$). In contrast, the addition of caffeine (2.5 and 5 mM) caused a marked reduction in sperm motility at T_{60} , with values below 4%. Likewise, treatments supplemented with sodium bicarbonate showed significantly lower motility compared to those without bicarbonate ($p < 0.05$). Regarding sperm vigor, at 15 minutes after treatment application, 26.7% of spermatozoa were classified in category A (high vigor), whereas 48.1% corresponded to category D. However, at 60 minutes, a considerable decrease in category A (5.6%) and an increase in category D (78.9%) were observed. In conclusion, the results suggest that supplementation with heparin could contribute to preserving sperm motility in refrigerated boar semen, whereas the incorporation of caffeine and, especially, sodium bicarbonate, is not favorable under the experimental conditions evaluated.

Keywords: refrigerated boar semen, sperm motility, sperm vigor.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....1

HIPÓTESIS2

OBJETIVOS3

1. Objetivo general.....3

2. Objetivos específicos3

CAPÍTULO I4

1. MARCO TEÓRICO.....5

1.1. La inseminación artificial, su importancia en el desarrollo de la industria porcina5

1.2. Características del semen porcino6

1.3. Proceso de colecta8

1.4. Evaluación o contrastación seminal11

1.5. Dilución y conservación del semen fresco, uso de dilutores14

1.6. Problemática en la conservación y calidad del semen refrigerado durante el almacenamiento.....17

1.7. Consideraciones a tener en cuenta sobre la calidad de la dosis seminal para realizar la IAp:.....19

1.8. La heparina, cafeína y bicarbonato de sodio y sus potenciales beneficios en la mejora de la motilidad:20

2. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....21

CAPÍTULO II28

1. MATERIALES29

1.1. Materiales para la obtención y conservación de semen.....29

1.2. Materiales para realizar el protocolo de tratamiento y evaluación.....29

2. METODOLOGÍA30

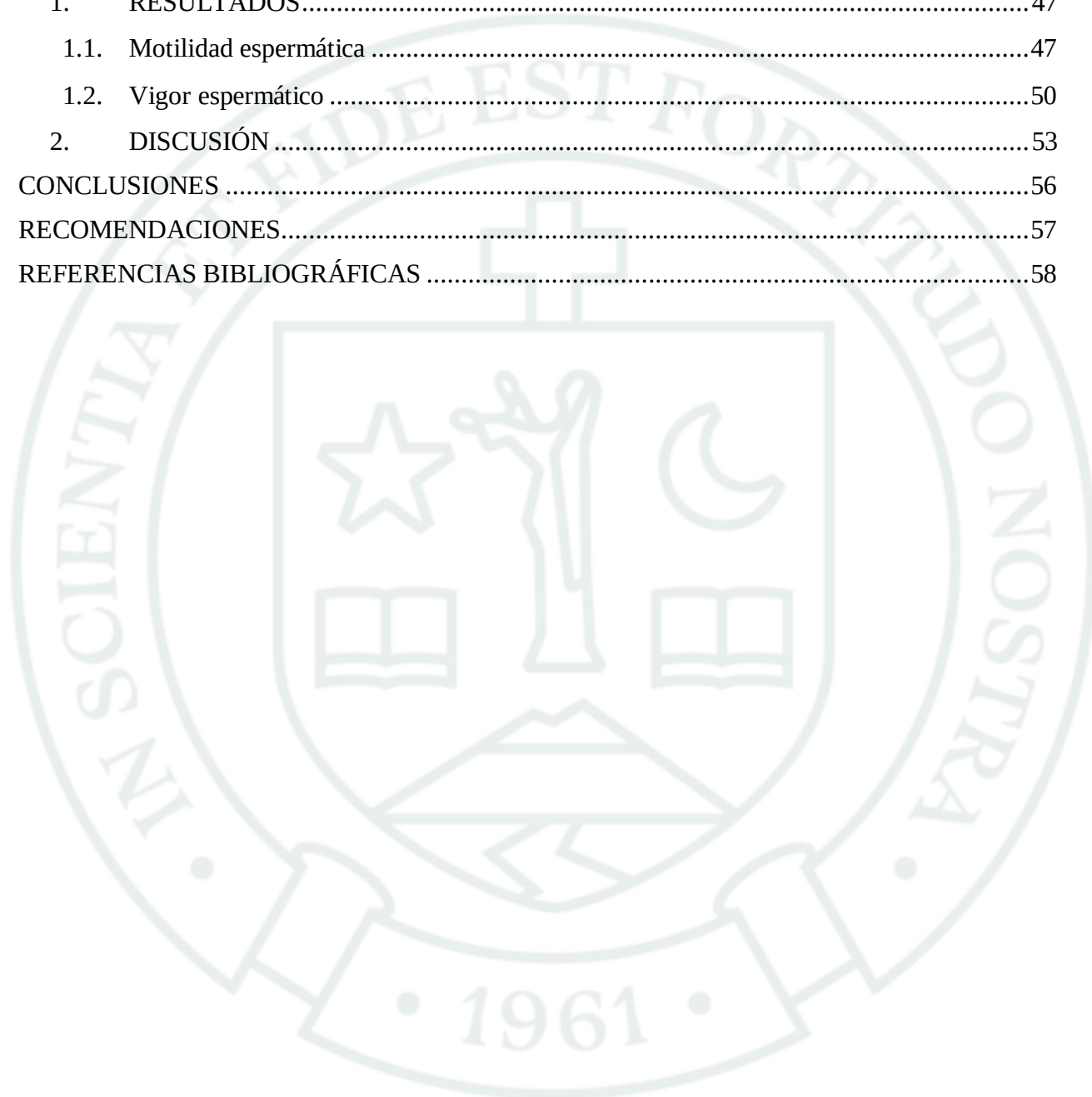
2.1. Selección y fundamentación del diseño experimental.....30

2.1. Determinación del volumen final de las unidades experimentales.....33

2.2. Estandarización de soluciones intermedias y precisión experimental.....34

2.3. Matriz de tratamientos y esquema de dosificación volumétrica38

2.4. Caracterización de la muestra biológica y protocolo de evaluación funcional	40
2.5. Estrategia de recolección de datos.....	42
2.6. Análisis estadístico de los datos	44
CAPÍTULO III.....	46
1. RESULTADOS.....	47
1.1. Motilidad espermática	47
1.2. Vigor espermático	50
2. DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis comparativo de costos de preparación de soluciones stock intermedias y costo operativo por unidad experimental (1 mL).....	38
Tabla 2: Matriz de distribución volumétrica para los 27 tratamientos experimentales	39
Tabla 3: Motilidad espermática (%) a 15 y 60 min según combinaciones de heparina, cafeína y bicarbonato.....	48
Tabla 4: Motilidad espermática (%) durante el envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta) evaluada a los 15 y 60 minutos.....	49
Tabla 5: Distribución porcentual del vigor espermático (A–D) en los tiempos de evaluación T15 y T60.	50
Tabla 6: Distribución porcentual del vigor espermático (A–D) durante el envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta)	52



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Variación de la motilidad espermática (%) durante el envejecimiento in vitro del semen porcino entre los días 4 y 8 postcolecta. Las evaluaciones se realizaron a los 15 minutos (T15) y 60 minutos (T60) posteriores a la incubación con las soluciones experimentales.....50
- Figura 2. Distribución porcentual de las categorías de vigor espermático (A–D) en los tiempos de evaluación T15 y T60.....51
- Figura 3. Distribución porcentual de las categorías de vigor espermático (A–D) durante el periodo de envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta)52



ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla 01: Parámetros de la evaluación seminal de los verracos donantes	64
Imágenes del desarrollo experimental.....	67



INTRODUCCIÓN

La porcicultura en el Perú constituye un sector dinámico cuya estructura productiva varía significativamente entre regiones. En la región San Martín, se concentra el 5.5 % de la población nacional de cerdos, caracterizándose por una predominancia del 60 % de pequeños porcicultores bajo sistemas de explotación semi-intensivos (1) . A pesar de las limitaciones en infraestructura y gestión de la fertilidad, estas unidades de producción han integrado la inseminación artificial (IA) como estrategia biotécnica para incrementar la eficiencia reproductiva y el progreso genético de sus plantales.

El éxito de la IA con semen fresco refrigerado depende de la capacidad de los diluyentes para mitigar el daño celular durante el almacenamiento. Si bien la capacidad productiva de un verraco de alto valor genético permite la obtención de 15 a 30 dosis por eyaculado —bajo estándares de 3,500 millones de células espermáticas en 100 ml—, la logística de distribución en la Amazonía peruana impone desafíos críticos (2). La conservación de la integridad del acrosoma, la funcionalidad de la membrana plasmática y, fundamentalmente, la motilidad progresiva, son parámetros determinantes de la capacidad fecundante que se ven alterados por el tiempo de almacenamiento y las fluctuaciones térmicas durante el transporte.

La justificación de la presente investigación se fundamenta en la necesidad de revertir o mitigar el deterioro fisiológico del espermatozoide durante su fase de senescencia. En condiciones comerciales, las dosis seminales se emplean preferentemente dentro de las primeras 72 horas; no obstante, a partir del cuarto día postcolecta, se inicia un proceso de degradación caracterizado por la peroxidación lipídica y el agotamiento de las reservas de ATP (3). En la región San Martín, los trayectos de transporte suelen superar las 48

horas bajo condiciones precarias de cadena de frío, lo que acelera el estrés celular y obliga al descarte de material biológico, generando pérdidas económicas sustanciales.

Evaluar la respuesta funcional de los espermatozoides entre los días 4 y 8 postcolecta resulta crítico para la industria. Durante este periodo, la refrigeración prolongada induce cambios en la fluidez de la membrana que predisponen a una capacitación prematura o "efecto tipo capacitación" (4). Por consiguiente, el uso de agentes farmacológicos que actúen como moduladores metabólicos adquiere relevancia científica. La literatura sugiere que la combinación de heparina (un análogo de los glicosaminoglicanos), cafeína (inhibidor de la fosfodiesterasa) y bicarbonato de sodio (regulador del pH y activador del adenilato ciclasa) pueden potenciar la motilidad y el vigor espermático al estimular las vías de señalización intracelular del AMPc (5).

Bajo esta premisa, el presente trabajo de tesis evalúa el efecto de la heparina, cafeína y bicarbonato de sodio sobre la cinética espermática en fases críticas de envejecimiento in vitro. A través de un diseño experimental controlado, se busca determinar si estos compuestos pueden sostener la actividad metabólica de células con vitalidad comprometida. Los resultados pretenden aportar evidencia técnica para optimizar el uso de diluyentes de larga duración, mejorando la sostenibilidad y competitividad del sector porcino mediante la recuperación del vigor espermático en dosis próximas a su caducidad.

HIPÓTESIS

Dado que en estudios in vitro, en diferentes especies, la heparina, cafeína y bicarbonato de sodio, favorecen la recuperación y la activación/capacitación espermática, mejorando significativamente la motilidad de los espermatozoides; es probable que, en condiciones de campo, adicionadas en dosis seminales a partir del cuarto día postcolecta, estas características se potencien o mantengan permitiendo prolongar al máximo posible la

capacidad fecundante de las células espermáticas porcinas, haciendo que su uso en la práctica diaria, sea viable y rentable en la inseminación artificial porcina.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Evaluar el efecto combinado y/o independiente de la heparina, cafeína y bicarbonato sobre la motilidad de las células espermáticas porcinas, contenidas en dosis de semen fresco refrigerado para inseminación artificial de 4 verracos adultos, de diferentes líneas terminales, mayores de 1 año, en los días 4, 5, 6, 7 y 8 postcolecta.

2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración óptima individual o combinada de heparina, cafeína y bicarbonato de Sodio, que maximiza la motilidad en semen fresco porcino.
- Analizar el efecto inmediato (15 minutos post-adición) y el efecto sostenido (60 minutos post-adición), de las soluciones de heparina, cafeína y bicarbonato de Sodio sobre la motilidad en semen fresco porcino.
- Evaluar el potencial de aplicación práctica del uso de heparina, cafeína y bicarbonato de sodio en programas de inseminación artificial porcina.



1. MARCO TEÓRICO

1.1. La inseminación artificial, su importancia en el desarrollo de la industria porcina:

En la porcicultura moderna, el desempeño reproductivo es la principal preocupación de los productores, ya que la estabilidad económica de su empresa depende de la producción de lechones (6); es en este punto, donde las técnicas de asistencia reproductiva como la Inseminación Artificial (IA) han mejorado notablemente los índices reproductivos de la gran mayoría de las unidades de producción porcina (7).

Si bien es cierto que en términos de desarrollo tecnológico, en esta especie a diferencia de otras, el uso de semen congelado de forma masiva, ha encontrado serias limitaciones; no obstante, por su metodología sencilla y buenos resultados, la inseminación artificial porcina (IAp), con semen fresco refrigerado, se ha convertido en una forma rutinaria de reproducción en todos los niveles de explotaciones porcinas, llegando a utilizarse en la actualidad en un rango superior al 90% de las explotaciones de tipo tecnificado y semi tecnificado, lo que ha permitido situar a este sector productivo, como una de las industrias cárnicas más importantes a nivel mundial (8,9,10).

Por tanto, la IAp, representa uno de los avances científicos más destacados en el desarrollo de esta agroindustria, acarreando grandes ventajas para el sector, ya que ha permitido incrementar los niveles de producción mediante un desempeño y rendimiento reproductivo, en los que la tasa de concepción (TC) puede llegar hasta el 100%, lo cual conlleva también al incremento de la tasa de partos y el incremento del número de crías al parto (NCP). Asimismo, teniendo en cuenta que, en esta especie doméstica, los caracteres de interés productivo-económico, presentan una heredabilidad alta, al adquirir semen proveniente de reproductores especializados, el

alto valor genético de las dosis seminales es una garantía del nacimiento de un lechón con alto potencial productivo, lo que le permite al productor obtener canales de óptima calidad y mejorar los parámetros productivos y sanitarios, permitiendo reducir los costos de producción.

La Inseminación Artificial porcina (IAp), básicamente consiste en la recolección de semen de un verraco (macho porcino), su procesamiento y posterior introducción en el tracto reproductivo de una cerda mediante métodos artificiales, pretendiendo conseguir su gestación, sin necesidad de apareamiento directo; el semen puede ser usado tanto congelado o fresco refrigerado, este último, con entre 1.500 y 3.000 millones de espermatozoides por dosis conservados hasta siete días en diluyentes a largo plazo, es de uso común y es en gran medida responsable del uso generalizado de la IAp (10,11).

1.2. Características del semen porcino.

El semen porcino está compuesto por dos elementos principales: los espermatozoides y el plasma seminal. Su composición química y biológica es clave para garantizar la fertilidad y su conservación durante el proceso de la inseminación artificial. En promedio el volumen de una eyaculación oscila entre 150 y 300 ml conteniendo aproximadamente de 200 a 300 millones de espermatozoides por mililitro, lo que hace entre 30 a 60 mil millones por eyaculado. Tiene un pH entre 7.2 y 7.8, una coloración lechosa a blanco cremosa, dependiendo de la concentración espermática y un olor característico debido a compuestos propios del plasma seminal. Las células espermáticas son altamente sensibles a cambios ambientales, como el frío y el estrés osmótico, debido a la estructura de sus membranas lipídicas, y dependen de sustratos como glucosa, lactato y fructosa para generar energía. Por su parte el plasma seminal

actúa como medio de transporte y protección para los espermatozoides, contiene enzimas, proteínas y antioxidantes que influyen en la viabilidad espermática (12,13).

1.2.1. Factores que influyen en la calidad y principales características seminales

del verraco: La variación en la calidad seminal del verraco es multifactorial, está relacionada con la edad, línea genética, frecuencia de colección, estado nutricional y de salud de los reproductores, estimulación sexual antes de la colecta y la estación del año. Estos factores influyen de manera directa e indirecta en las principales características seminales, como el volumen del eyaculado, pH, concentración espermática, motilidad, funcionalidad de la membrana celular, integridad del acrosoma y presencia de espermatozoides anormales (14).

Por citar los principales factores, tenemos que, a medida que el verraco alcanza la madurez sexual completa, aproximadamente entre los 12 y 24 meses de edad, se incrementa la eficiencia espermatogénica y se estabilizan los parámetros seminales, alcanzándose el pico reproductivo en edades comprendidas entre los 18 y 30 meses, periodo en el cual se reportan mejores índices de concentración, motilidad progresiva y resistencia al almacenamiento refrigerado. Posteriormente, conforme avanza la edad, pueden manifestarse cambios degenerativos graduales asociados al envejecimiento testicular, incremento del estrés oxidativo, alteraciones mitocondriales y reducción en la estabilidad de membrana plasmática, factores que repercuten negativamente sobre la motilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides (12)

Asimismo, La genética del verraco representa un factor determinante sobre la calidad seminal, debido a diferencias hereditarias relacionadas con el volumen

eyaculado, concentración espermática, integridad de membrana, metabolismo celular y resistencia al almacenamiento refrigerado (8). En líneas terminales como Pietrain y Duroc se han descrito diferencias en concentración celular, resistencia al estrés oxidativo y tolerancia a procesos de refrigeración prolongada, mientras que líneas maternas como Landrace y Large White suelen mostrar variaciones en volumen seminal y composición del plasma seminal; estas diferencias raciales pueden influir directamente sobre parámetros funcionales como motilidad progresiva, vigor espermático y longevidad celular, particularmente cuando las dosis seminales son sometidas a almacenamiento prolongado o variaciones de temperatura (13,15).

1.3. Proceso de colecta

La colecta es el procedimiento mediante el cual se obtiene el semen de un verraco, bajo condiciones controladas de higiene y de seguridad tanto para el operador como para el verraco, principalmente mediante técnicas manuales, utilizando un maniquí o potro de monta, o de ser el caso una cerda en celo como estímulo (12). La técnica más correcta para la extracción es la del “doble guante” o de la “mano enguantada”, donde el guante externo (segundo), mantiene limpio al guante interno (primero) hasta el momento inmediatamente anterior al inicio de la sujeción del pene para comenzar la recogida (16).

Se pueden distinguir las siguientes etapas durante este proceso:

a. Preparación previa

- **Selección del verraco:** Se emplean ejemplares que, **desde su nacimiento**, por su línea genética, con respecto a los registros de padres y abuelos, fueron seleccionados evaluando principalmente tres aspectos: línea mamaria (se reflejará en sus hijas, si se trata de una línea materna), peso al nacimiento y

testículos (que hayan descendido ambos y sean simétricos). **Al destete** condición de los testículos, peso al destete y ganancia diaria de peso (GDP). **A los 80 kg:** GDP, testículos (simetría y adherencias). Siendo la selección final **a los 5 meses**, evaluando un conjunto de características como el tiempo que tardan en alcanzar su pubertad, aplomos y conformación, número y conformación de las tetas, tamaño testicular, peso y condición corporal (17). Asimismo, se deben elegir animales sanos, libres de enfermedades transmisibles y con óptimo estado corporal y reproductivo. Es importante evaluar su historial sanitario y productivo.

- **Condiciones del ambiente:** El área destinada para la recolección debe ser tranquila, limpia y bien ventilada, con un piso antideslizante. Es fundamental minimizar cualquier interferencia externa, como ruidos o presencia de personas ajenas al proceso, para evitar distracciones o estrés en el animal.
- **Temperatura ideal del ambiente:** Mantener una temperatura entre 18-22°C es crucial, ya que el estrés térmico puede afectar negativamente la calidad del semen. En climas cálidos, se deben tomar medidas para enfriar el ambiente, como ventiladores o sistemas de enfriamiento.
- **Estimulación previa:** Los verracos son expuestos a estímulos visuales y olfativos, como la presencia de una hembra en celo, un potro o un maniquí, que deben ser de construcción sólida sin bordes afilados, esto incrementa su excitación sexual, facilitando el proceso de recolección. Es importante realizar esta estimulación de manera adecuada para evitar el agotamiento del animal (18,19).

b. Proceso de recolección

- **Preparación del operario:** cuando el animal está sobre el potro, este procederá a la eliminación mediante masajes continuos y suaves, del contenido prepucial, que es una mezcla de orina residual, secreciones glandulares (feromonas) y detritos celulares acumulados en el interior del prepucio, ya que es una fuente rica en bacterias y otros compuestos contaminantes que pueden alterar la viabilidad del semen colectado para su procesamiento; en este punto se puede aprovechar para recortar el pelo de la zona de apertura del prepucio, limpiándose con toallas desinfectantes que se descartan junto al guante externo de la mano del operario (16,19).
- **Método de recolección:** Una vez asegurada la limpieza de la zona prepucial, se procede a la colecta en sí; con la mano cubierta con el guante interior se hace una presión firme a nivel del glande, el extremo espiral del pene, para que el pene no pueda girar, colocándolo en posición horizontal, manteniéndola así durante todo el proceso de eyaculación. Este proceso imita la presión aplicada por la forma de sacacorchos de la vagina de la cerda (16,18).

c. Recolección fraccionada

La eyaculación es un proceso fisiológico altamente coordinado que involucra eventos neurológicos y musculares (20). El eyaculado porcino, que tiene tres porciones, se recibe en una bolsa de recogida de semen hecha de plástico de un solo uso y es desechable, la misma que lleva un filtro incorporado que impide la mezcla de la fracción espermática del eyaculado con el gel o tapioca u otras partículas extrañas, asegurando la higiene, y previniendo su contaminación; la bolsa se sitúa dentro de un termo para mantener la temperatura cercana a 37°C (12,16).

- **Fracción pre-espermática:** constituyen entre 10 a 25 ml de un líquido claro y acuoso que no contienen espermatozoides y no debe ser colectada ya que puede tener un alto recuento bacteriano rica en fluidos uretrales (18).
- **Fracción espermática:** son entre 40-100 ml, de aspecto muy calcáreo y contiene entre el 80 y el 90 % de todos los espermatozoides presentes en el eyaculado, se recoge cuidadosamente (18).
- **Fracción post-espermática:** son entre 70 – 300 ml de un líquido más claro y acuoso, constituido principalmente por plasma seminal, a menudo descartada para evitar la estimulación de los espermatozoides si queremos conservar el semen por más de 24 horas (16,18).
- El proceso de eyaculación puede prolongarse entre 5 a 15 minutos; recomendándose hasta 2 colectas por semana para verracos mayores de un año que han alcanzado su pico de producción, por el contrario, solo se recomienda 1 colecta por semana, para verracos jóvenes menores de un año, con la finalidad de asegurar la reposición espermatogénica que garantice una adecuada producción de células espermáticas viables, lo que garantizará la calidad seminal y por ende de las dosis seminales producidas.

1.4. Evaluación o contrastación seminal

La evaluación visual de la opacidad del eyaculado proporciona una idea aproximada de la concentración de espermatozoides. Sin embargo, este método es rudimentario y muy subjetivo, por lo que no es adecuado para centros de IA con una gran producción de semen para su comercialización (18).

La contrastación del semen es fundamental para detectar problemas de subfertilidad e infertilidad en el verraco; esta evaluación, en la práctica debe ser sencilla, rápida y económica. Esta se realiza en dos etapas:

a. Evaluación macroscópica

- **Color:** se verifica que el color blanco lechoso del semen es nítido, o presenta turbidez con otros tonos, como marrón, rojizo o amarillento.
- **Olor:** suigéneris. La variación del color y el olor pueden indicar alteraciones patológicas del aparato genital del macho o la contaminación del semen con orina durante el proceso de colecta (16).
- **Volumen:** el volumen normal de la fracción espermática oscila entre 40 a 100 ml; variando como se estableció líneas arriba, según la edad, raza y estado fisiológico de cada verraco.
- **pH:** el pH del semen disminuye como efecto de la contaminación bacteriana, lo que es más notorio en dosis conservadas. El pH del semen de un verraco se encuentra entre 7,2 y 7,5. Cuando el pH es menor a este valor, la motilidad y el metabolismo de los espermatozoides se reducen gradualmente (21).

b. Evaluación microscópica

- **Motilidad:** en un porta objetos precalentado a 37 – 38 °C, se coloca una gota del eyaculado, utilizando el aumento 4X se evalúa el movimiento general o de progresión general, que se valora con porcentajes, y con el aumento 10 X hasta el 40X, el movimiento progresivo individual que valora el “vigor espermático”, en una escala de 0 a 5 (espermatozoide sin movimiento, con movimiento pobre, con desplazamiento en círculos, con movimientos progresivos sinuosos, con movimientos progresivos rápidos y movimientos progresivos muy rápidos, respectivamente). Se aceptan porcentajes de motilidad o progresión por encima del 75% con movimientos progresivos con puntuaciones de 3 y 4, rápidos y muy rápidos (16,22).

Mediante sistemas automatizados de análisis de imágenes “CASA”, se logran evaluaciones de motilidad más objetivas, permitiendo el análisis de trayectorias

y su clasificación porcentual por: vigorosidad o progresividad (estáticos, móviles no progresivos y móviles progresivos), velocidad (rápidos, medios, lentos y estáticos). De allí se obtienen calificaciones “Tipo A” para evaluaciones progresivas rápidas, “Tipo B” para evaluaciones progresivas lentas, “Tipo C” para evaluaciones no progresivas y “Tipo D para evaluaciones inmóviles (16).

- **Aglutinación:** al evaluar la motilidad espermática, se puede observar otros parámetros, como el aglutinamiento de la muestra que se puntúa de 0- 3 cruces, para representar los acúmulos de células más o menos grandes, que no se deben considerar en el porcentaje total de células en movimiento (16).

- **Contaminación:** los eyaculados siempre tienen cierta carga bacteriana, siendo un límite máximo permitido de 8 a 10 mil UFC/ml, aunque este valor es relativo, pues dependerá del tipo de bacterias presentes y su capacidad para multiplicarse y el daño potencial que puedan generar al semen (21). Microscópicamente hablando se puede puntuar el grado de contaminación microbiana de 0-3, teniendo en cuenta la cantidad de cuerpos extraños ajenos a la composición de un eyaculado, en los campos observados. Este parámetro va a indicar el grado sanitario de la muestra, muy relacionado con la higiene durante la recogida del semen (22).

Para ambos casos, aglutinación y contaminación, se tomarán como valores normales grados de 0-1 (22).

- **Concentración:** su valoración es fundamental ya que conocerla nos permitirá calcular el número de dosis que nos rendirá el eyaculado evaluado, básicamente consiste en determinar el número de células espermáticas por unidad de volumen.

Existe una diversidad de métodos para determinarla, los más usuales son en orden de sencillez y costo: recuento celular (usando la Cámara de Neubauer o la

de Bürker), colorimetría (usando un espectrofotómetro) y el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) (16).

- **Anormalidades:** las anomalías espermáticas son consecuencia de patologías genitales en los verracos (23). Las anomalías morfológicas se consideran primarias, cuando está comprometida la cabeza del espermatozoide y la función de las mitocondrias, que son importantes para el movimiento de los flagelos. Las anomalías secundarias, como la gota citoplasmática distal o proximal y anomalías en la cola, no son determinantes y el daño se puede compensar con una mayor dosis seminal. Las anomalías terciarias son aquellas adquiridas durante el procesamiento del semen, la más común en este grupo es la "cola enrollada".

El porcentaje máximo de anomalías primarias y secundarias permitido es de 10 y 20%, respectivamente. El porcentaje de espermatozoides normales debe estar por encima del 70% (24).

1.5. Dilución y conservación del semen fresco, uso de dilutores

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 (25), para ello se deben tener en cuenta las características del espermatozoide porcino que lo hacen tan sensible a los cambios o contrastes de temperatura. La temperatura del eyaculado en el momento de la colecta es de 37°C, donde el metabolismo del espermatozoide está en su máximo nivel, por lo tanto, debemos conseguir disminuirlo hasta niveles de mantenimiento. Después de la eyaculación, la motilidad espermática y vitalidad se conservará únicamente durante unas horas. Para evitar la temprana pérdida de éstas y prolongar la supervivencia

espermática, esta actividad metabólica debe ser disminuida. Todo este proceso se logra en dos etapas claramente distinguibles:

- La primera de ellas es la dilución, mediante la adición de diluyente, que con la ayuda de sus componentes se logrará prolongar la vida útil del espermatozoide.
- La segunda, es la disminución de la temperatura, de forma progresiva hasta alcanzar el objetivo de 15-17°C, en la cual el espermatozoide se encuentra en un estado metabólico basal (26).

En el proceso de inseminación artificial porcina, seleccionar el diluyente para el semen tiene una importancia significativa en los resultados productivos. Alrededor del 90% del contenido de una dosis seminal es diluyente para semen. Este tiene un par de funciones importantes. Una de ellas es aumentar el volumen del semen para permitir la producción de un número de dosis por cada eyaculado; la otra es preservar las características funcionales de los espermatozoides y mantener un nivel óptimo de fertilidad (27). Por tanto, 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 (25,28). En resumen, 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
- Estabilizar las membranas de los espermatozoides

A nivel práctico de acuerdo a las condiciones de producción, los diluyentes se clasifican en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación del

semen a corto plazo (1-3 días) o aquellos que tienen como objetivo la conservación del semen por más de 4 días considerados como diluyentes a largo plazo (25).

Durante el proceso de dilución del eyaculado porcino, uno de las principales preocupaciones en el procesamiento, es la influencia negativa que los cambios de temperatura durante el proceso de dilución, tienen sobre la calidad seminal, por lo tanto, la recomendación general es que no haya una diferencia mayor de $\pm 1-2^{\circ}\text{C}$ entre el eyaculado puro y el diluyente (26).

El grado de dilución, un parámetro que relaciona el volumen del eyaculado, la concentración, el número de dosis y el volumen de diluyente a añadir, también es otra situación por resolver durante el procesamiento del eyaculado en dosis seminales. Cuando se tienen eyaculados de gran volumen, pero con una baja concentración, el número de dosis a producir será bajo y el volumen de diluyente a añadir será pequeño, tendremos un grado de dilución bajo. Por el contrario, cuando se trate de eyaculados muy concentrados con bajo volumen, con los que se pueda hacer un elevado número de dosis, el volumen de diluyente será muy alto y el grado de dilución será elevado. En la práctica, los límites del grado de dilución han sido establecidos entre rangos que van desde $>1:4$ y $<1:16$, siendo la dilución ideal $1:10$. (29).

Finalmente, una vez que se ha procedido a la dilución y el envasado de las dosis, se debe proseguir con la disminución de la temperatura, hasta llegar a la temperatura de almacenamiento; la temperatura de referencia continúa siendo la refrigeración entre los $15-17^{\circ}\text{C}$ con resultados excelentes en fertilidad ($+90\%$). Para llevar la dosis seminal a este rango de temperatura, el enfriamiento lento, sigue siendo de la elección de los centros de producción de dosis seminales, el cual consiste dejar descender por aproximadamente 20 minutos la temperatura inicial de dilución ($36-37^{\circ}\text{C}$), hasta los 22 a 25°C (temperatura ambiente), permitiendo la adaptación de las células

espermáticas a su nuevo medio hasta por un máximo de 2 horas, cuando se procede a refrigeración en los rangos de temperatura ya mencionados (30).

1.6. Problemática en la conservación y calidad del semen refrigerado durante el almacenamiento.

La conservación y calidad del semen porcino refrigerado presentan desafíos importantes que afectan directamente la viabilidad espermática debido a que ocurren cambios estructurales y funcionales en los espermatozoides consecuencia del proceso natural de envejecimiento (31).

Los principales factores que influyen en el deterioro del semen durante el almacenamiento incluyen aspectos fisiológicos, ambientales, y técnicos. Dentro de los factores fisiológicos hay que entender la naturaleza especial de la membrana celular del espermatozoide porcino, que los hace particularmente sensibles al estrés oxidativo y al daño durante el almacenamiento debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática. Asimismo, la producción normal de especies reactivas de oxígeno (ROS) genera daño lipídico, proteico y del ADN, comprometiendo la viabilidad espermática o en menor medida provocando disminución de la motilidad (32).

Los factores ambientales que pudiesen afectar la calidad del semen refrigerado están relacionados con el mantenimiento de la cadena de frío, es decir las variaciones de temperatura que pudiesen darse durante su almacenamiento y/o transporte; rangos de temperaturas anormales por debajo de los 15°C, provocan daños irreversibles a nivel en la membrana celular espermática. Asimismo, se estima que, a partir del tercer día de conservación, la calidad de la dosis seminal comienza a disminuir progresivamente debido a alteraciones metabólicas y acumulación de ROS (31,32).

La elección del diluyente tiene un impacto crítico en la calidad del semen almacenado, y constituyen un factor técnico que podría afectarla, estos deben contener antioxidantes, buffer apropiado, antibióticos y nutrientes esenciales para mantener la funcionalidad celular, uno nutriente que no puede faltar es la glucosa, la misma que dentro de la temperatura de almacenamiento, facilita el crecimiento de bacteria Gram negativas, contaminación que conlleva entre otros aspectos, la disminución de la motilidad y aglutinación espermática, daño acrosomal y acidificación del medio. Por todo ello se deberá elegir apropiadamente el dilutor a usar ya que además de contener en su composición un antibiótico efectivo, también se deberá tener en cuenta que no todos los machos interaccionan de la misma manera con ellos (31).

El almacenamiento también podría ser considerado una falla técnica; el lugar que ocupa la dosis dentro de la conservadora es importante, es preferible evitar colocar las dosis cerca del elemento calefactor y del congelador o de la pared trasera, dependiendo de dónde se produzca el frío, ya que son zonas con mucha más fluctuación térmica que el rango de conservación del semen. Una mala disposición de la dosis puede ocasionar una sedimentación inadecuada de los espermatozoides, evitando su contacto con el diluyente, lo que puede generar una pérdida de la viabilidad por falta de nutrición del espermatozoide y la incapacidad de su detoxificación, por lo que es conveniente colocarlas de forma plana unas encima de otras, si son tubos uno encima de otro en direcciones contrarias y si son blíster en bandejas, de tal manera que cuando el semen decante quede en una superficie ancha y la mayoría de los espermatozoides estén en contacto con el diluyente. Hay que mover las dosis de manera periódica y homogeneizarlas antes de inseminar (33).

1.7. Consideraciones a tener en cuenta sobre la calidad de la dosis seminal para realizar la IAp:

Para obtener una inseminación fecundante exitosa es un punto clave, partir de una dosis de semen en buen estado de conservación con el volumen y concentración espermática adecuada (33,34). En cuanto a la temperatura de conservación ideal para el semen fresco refrigerado, esta se encuentra entre 16-18°C (60.8-64.4 °F) ; asimismo, el volumen y la concentración espermática por dosis de semen fresco refrigerado, depende si se trata de una Inseminación Artificial Cervical convencional (IAC) donde se ha estandarizado volúmenes que van desde 70 a 100 ml, , una concentración de $2-4 \times 10^9$ células espermáticas, o de una Inseminación Artificial Post Cervical (IAPC) con volúmenes que van desde los 30 a 60 ml conteniendo un alrededor de $1.5-0.5 \times 10^9$ células espermáticas, con valores del 60 a 80 % para la motilidad y la carga bacteriana de 0 a 1000 UFC/mL (7,8,35,36).

Para una adecuada conservación de las dosis de semen fresco refrigerado, comercialmente se ha estandarizado el uso de diluyentes conservantes que permiten mantener la capacidad fecundante de las células espermáticas entre 5 a 7 días, cuyos componentes aportan la energía indispensable para la supervivencia del espermatozoide, garantizan el equilibrio físico-químico (pH, equilibrio iónico), evitan la aglutinación y la precipitación de los espermatozoides en el diluyente y garantizan que no proliferen las bacterias durante la conservación, permitiendo una refrigeración progresiva por etapas para alcanzar 16-18°C con una variación mínima de temperatura (30)

En cuanto a su almacenamiento, es recomendable el uso de equipos lo suficientemente espaciosos para evitar que algunas dosis caigan en zonas con mucha fluctuación térmica, asimismo, es importante fijarse en la disposición de la dosis, ya

que una forma incorrecta puede ocasionar una sedimentación inadecuada de los espermatozoides, evitando su contacto con el diluyente, lo que puede generar una pérdida de la viabilidad por falta de nutrición del espermatozoide y la incapacidad de su detoxicación; finalmente se debe asegurar la homogenización periódica de las mismas, que permitirá una mejor distribución de los espermatozoides en el medio conservante (33).

Sin embargo, la calidad de las dosis seminales, reflejadas en la capacidad fecundante de los espermatozoides que contienen, puede verse afectada, en detrimento de la motilidad y viabilidad espermática, por diversos factores durante el almacenamiento, transporte y manipulación del semen previa a la IAp. En este punto es muy importante conocer en qué condiciones sale el semen de los centros de producción y cuál es curva de temperatura durante el transporte; por tanto se debe priorizar el mantenimiento de la cadena de frío o de conservación a una temperatura de equilibrio de 16 a 17°C, durante todo el trayecto, desde su salida del centro de producción, hasta la unidad de producción porcina donde se le dará uso, evitando que las dosis superen temperaturas superiores a 24°C, evitando, en todos casos, las oscilaciones térmicas y el recalentamiento (33).

1.8. La heparina, cafeína y bicarbonato de sodio y sus potenciales beneficios en la mejora de la motilidad:

Diversas intervenciones han sido exploradas para mejorar la motilidad, viabilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides. Los estimulantes espermáticos, conocidos como “aditivos o potenciadores seminales”, son sustancias que no siendo necesarias para la conservación seminal e incluso perjudiciales para la misma, sin embargo mejoran la fertilidad y/o la prolificidad del semen cuando son aplicadas a dosis seminales en el momento inmediatamente anterior a la inseminación de la

hembra, bien actuando sobre las características intrínsecas del semen (p. e : incrementando la motilidad, favoreciendo la capacitación espermática, etc.), o bien implicando en el organismo de la hembra inseminada reacciones favorables para el éxito fecundante de la inseminación.

Diversos estudios, in vitro, en diferentes especies reportan sobre el efecto del uso de heparina, cafeína y bicarbonato de sodio, ya sea de forma individual o combinada, sobre la motilidad y viabilidad espermática al interactuar con procesos celulares críticos como la capacitación, la reacción acrosómica y el metabolismo energético de los espermatozoides (37).

Estudios han demostrado que la heparina facilita la capacitación mediante la interacción con glicoproteínas de la membrana espermática, mientras que el bicarbonato de sodio estimula la redistribución de colesterol y la fluidificación de la membrana, esenciales para la capacitación, asimismo ayuda a regular el pH intracelular y facilita el movimiento flagelar. Por su parte, la cafeína actúa como un estimulante metabólico, promoviendo la motilidad progresiva al aumentar la disponibilidad de ATP. Sin embargo, estos efectos dependen de las concentraciones utilizadas y las condiciones específicas del medio de cultivo (37,38).

2. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Bamba, K y Kojima, Y, 1981; analizan el uso de portaobjetos tratados con cafeína para evaluar la motilidad de los espermatozoides de cerdo. Se enfoca en determinar si la cafeína aplicada directamente en los portaobjetos puede actuar como un estimulante que mejore la actividad espermática, ofreciendo una herramienta práctica y eficiente para análisis en laboratorios de reproducción. Los portaobjetos tratados con cafeína mostraron una mejora significativa en la motilidad progresiva de los espermatozoides, la concentración de cafeína utilizada en los portaobjetos influyó directamente en los niveles

de estimulación de la motilidad, no observándose un impacto negativo en la viabilidad celular de los espermatozoides, lo que sugiere que el método es seguro para análisis. Las dosis de cafeína utilizadas oscilan entre 1 mM y 5 mM, y son las concentraciones comúnmente empleadas para evaluar su efecto en la motilidad espermática. Estas dosis están diseñadas para aumentar los niveles intracelulares de AMPc y estimular la motilidad sin comprometer la viabilidad de los espermatozoides (39).

Parrish et al. 1988, es un estudio clave en el campo de la fisiología espermática y la reproducción asistida en bovinos, cuyo propósito fue comprender el proceso de capacitación espermática, utilizando la heparina, un glucosaminoglicano, como agente para inducir la capacitación de los espermatozoides bovinos in vitro. Se analizó la eficacia de la heparina en la inducción de la capacitación espermática al compararla con otras condiciones., también se observaron cambios en la movilidad, morfología y funcionalidad de los espermatozoides tras la exposición a heparina, donde los espermatozoides capacitados mostraron una mayor capacidad para realizar la reacción acrosomal y fertilizar óvulos. Este trabajo sentó las bases para el uso de agentes como la heparina en protocolos de FIV, mejorando la comprensión de la biología espermática (40).

Sánchez J, et al, 1996, investiga la capacidad de los espermatozoides de cerdo para unirse a la heparina y cómo esta interacción se relaciona con parámetros estándar de calidad seminal. Este trabajo se centra en comprender el papel de la heparina en los procesos espermáticos como la capacitación, la motilidad y la fertilización, así como su utilidad como marcador de calidad del semen. La heparina, un glucosaminoglicano, interactúa con proteínas específicas en la membrana espermática. Esta unión es crucial para desencadenar la capacitación espermática y, posteriormente, la reacción acrosomal. Los autores correlacionan la capacidad de los espermatozoides para unirse a la heparina con parámetros de calidad seminal como: motilidad espermática, viabilidad celular y

morfología espermática. Se analiza si una mayor afinidad por la heparina está relacionada con una mayor calidad y capacidad fertilizante (41).

Pereira R.J, et al, 2000. analizan cómo tres compuestos —heparina, cafeína y el ionóforo de calcio A23187— influyen en la inducción de la reacción acrosomal en espermatozoides bovinos y caprinos descongelados. Este proceso es clave para que los espermatozoides puedan fertilizar ovocitos durante procedimientos de fertilización in vitro (FIV). Los resultados arrojan que los tres compuestos, solos o en combinación, muestran eficacia para inducir la reacción acrosomal, aunque la respuesta varía entre especies. El ionóforo de calcio A23187 suele ser más directo en la inducción, mientras que la heparina y la cafeína son más efectivas en el contexto de la capacitación previa (42).

Holt, W. y Harrison R, 2002. estudian cómo el bicarbonato estimula la motilidad de los espermatozoides de cerdo a través de una vía dependiente de la proteína quinasa A (PKA). Además, investiga las diferencias en la respuesta al bicarbonato entre células individuales y entre diferentes eyaculados, descartando que dichas diferencias se deban a deficiencias en la activación de la PKA. Los hallazgos de este estudio indican entre otros, que el bicarbonato puede ser un componente crucial en la formulación de medios de capacitación y recuperación espermática en programas de inseminación artificial o fertilización in vitro. Mencionan además que, por lo general, las concentraciones efectivas de bicarbonato utilizadas oscilan entre 15 mM y 25 mM, que son suficientes para activar la vía de la proteína quinasa A (PKA) y promover la capacitación espermática sin comprometer la viabilidad celular. Estas concentraciones se utilizan comúnmente en medios de capacitación espermática y se consideran óptimas para inducir cambios funcionales en la membrana espermática y mejorar la motilidad progresiva. (43).

Salgado et al. 2005, exploran cómo la heparina y diferentes concentraciones espermáticas afectan la tasa de fertilización en procedimientos de fertilización in vitro (FIV) en bovinos. La investigación evaluó cómo la heparina, conocida por inducir la capacitación espermática (un proceso necesario para que los espermatozoides puedan fertilizar óvulos), afecta la tasa de fertilización de los ovocitos en un ambiente controlado in vitro. Uno de los principales resultados fue que la heparina mejoró significativamente el porcentaje de fertilización al promover la capacitación espermática (44).

Risopatron J., et al, 2005. Evaluaron in vitro el efecto de diferentes concentraciones de heparina sobre la capacitación espermática in vitro en canino. Estos resultados sugieren que la adición de 50 µg/mL de HE al medio capacitante (CCM) incrementa ($P < 0,05$) los porcentajes de reacción acrosomal (RA) a partir de las 3 horas de incubación (38).

Dapino D.G, et al, 2006. Estudiaron el efecto de la heparina sobre la capacitación in vitro de espermatozoides de verraco. La incubación de espermatozoides en medio capacitador (CM) suplementado con heparina 10 mM por hasta 120 min, mostró un aumento en el número de espermatozoides capacitados y espermatozoides reaccionados con acrosoma (RA), sin afectar su viabilidad. Asimismo, la presencia de calcio y bicarbonato estimuló la capacitación, que aumentó aún más con la adición de heparina. Estos resultados sugieren que la heparina mejora la capacitación in vitro del espermatozoides porcino sólo en condiciones de capacitación. El efecto in vitro de la heparina descrito en este trabajo indica que los Glicosaminoglicanos sulfatados, que normalmente están presentes en el tracto reproductivo femenino, podrían desempeñar un papel importante en el proceso de fertilización en porcinos (45).

Lee E, 2008; examina cómo los componentes del medio de fertilización, específicamente Tris, bicarbonato de sodio y cafeína, afectan la capacidad fertilizante in vitro de los espermatozoides de cerdo congelados en pajillas, obteniendo una mejora significativa en

la motilidad y la viabilidad espermática con medios que contienen bicarbonato y cafeína, debido a su efecto estimulante en los procesos de capacitación., el efecto estabilizador del Tris contribuye a mantener la funcionalidad espermática a través de la regulación del pH, observándose un incremento en las tasas de fertilización en los medios que combinan estos compuestos. Este estudio proporciona información valiosa sobre cómo optimizar los medios de fertilización para mejorar la calidad espermática y las tasas de fertilización in vitro, con aplicaciones prácticas en programas de reproducción asistida en la industria porcina (46)

Borges, M, 2012; en su disertación de maestría investiga el efecto de la adición de cafeína al semen porcino, ya sea en estado refrigerado o descongelado, para evaluar su impacto en parámetros de calidad seminal como motilidad, viabilidad, integridad de membrana y capacidad fertilizante. Las mejoras en la motilidad y viabilidad en el semen tratado con cafeína, particularmente en el descongelado, donde el daño celular es más severo y los efectos potenciales de la cafeína en la capacitación espermática, lo que podría aumentar la eficiencia de la inseminación artificial, permiten concluir que dicha sustancia puede ser utilizada para optimizar protocolos de manejo de semen en la industria porcina, aumentando la eficiencia de las técnicas de inseminación artificial y mejorando la fertilidad en programas reproductivos (47).

Nabavi, et al, 2013; el propósito del presente estudio es evaluar el impacto de la cafeína en la activación espermática (motilidad y vitalidad) y su influencia en la capacidad de los espermatozoides para fertilizar ovocitos in vitro, además de comparar la eficacia de dos medios de cultivo, T6 y M16, para sostener estas funciones bajo la influencia de cafeína. Los resultados obtenidos fueron la mejora de la motilidad espermática y la vitalidad en presencia de cafeína en ambos medios, aunque el grado de mejora pudo haber variado entre ellos. Asimismo, se logró el aumento en las tasas de fertilización in vitro debido a

la mayor eficacia de los espermatozoides capacitados. Este estudio tiene relevancia para optimizar protocolos de FIV en ratones, que a menudo son utilizados como modelos en investigación biomédica, siendo los hallazgos extrapolables a otras especies en el desarrollo de medios de capacitación y fertilización asistida (48).

El trabajo de Soriano, et al, (2019), trata sobre la optimización del proceso de capacitación espermática en cerdos mediante la modificación de las concentraciones de bicarbonato en los medios de capacitación. Este estudio se centra en cómo ajustar este parámetro puede mejorar los resultados de la fertilización in vitro (FIV) en esta especie, conocida por sus desafíos en la reproducción asistida debido a las características únicas de sus espermatozoides. En el estudio se examinan cómo diferentes concentraciones de bicarbonato en los medios de cultivo afectan la motilidad, viabilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides porcinos y se determinan rangos óptimos que maximizan el éxito de la FIV, minimizando efectos negativos como la hiperactivación excesiva o la pérdida de viabilidad (49).

El artículo de De Mercado, E, et al, 2020; trata sobre las estrategias y técnicas para mejorar la motilidad de los espermatozoides de cerdo tras el proceso de criopreservación. La motilidad es un parámetro clave para evaluar la calidad del semen y su capacidad fertilizante, pero tiende a deteriorarse durante y después del proceso de congelación y descongelación debido a daños celulares y cambios en las propiedades bioquímicas y estructurales de los espermatozoides. Resalta cómo el uso combinado de bicarbonato y cafeína puede contrarrestar los efectos negativos de la criopreservación en los espermatozoides porcinos, ya que el bicarbonato prepara las condiciones bioquímicas y la cafeína amplifica la motilidad. Estos compuestos ayudan a restaurar la funcionalidad espermática, mejorando su capacidad para participar en la fertilización, por ello suelen

incluirse en medios de recuperación o activación espermática para maximizar el rendimiento del semen crio preservado. (50).

Umezu, K, et al, 2021; examina cómo la cafeína afecta la desagregación de espermatozoides que están unidos entre sí por sus cabezas (aglutinación cabeza a cabeza), un fenómeno observado en el semen bovino. Este proceso es importante porque la aglutinación puede interferir con la movilidad y funcionalidad espermática, afectando la capacidad fertilizante. Este estudio reporta que la cafeína induce de manera efectiva la desagregación de los espermatozoides aglutinados, observándose un incremento en la motilidad progresiva de los espermatozoides tras la desagregación, sin presentarse algún efecto adverso significativo en la viabilidad o integridad celular (51)

Halo, M, et al, 2022; analiza cómo la cafeína influye en la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides de caballo bajo diferentes condiciones de temperatura, lo cual es relevante para la conservación y manejo de semen equino en reproducción asistida. Algunos de los resultados obtenidos en el presente estudio fueron el incremento significativo en la motilidad a todas las temperaturas, aunque los efectos podrían variar dependiendo de la concentración de cafeína y el tiempo de exposición y el potencial efecto protector de la cafeína sobre la viabilidad espermática en condiciones de enfriamiento o estrés térmico. El trabajo concluye que la cafeína puede ser una herramienta útil para mejorar la funcionalidad espermática, especialmente en el contexto la biotecnología reproductiva equina, donde la optimización de los protocolos de refrigeración y el mantenimiento de la capacidad fecundante tras el estrés térmico son fundamentales para mejorar las tasas de preñez en programas de inseminación artificial con semen transportado (52).



CAPÍTULO II

1. MATERIALES

1.1. Materiales para la obtención y conservación de semen

- Materiales y equipos para la colecta de semen:

Incluye el uso de un maniquí o potro de colecta, termo y bolsas de colección, guantes de vinilo para la técnica del doble guante, toallitas desinfectantes, y en general todo lo necesario para realizar la colecta del semen en condiciones controladas, facilitando su recolección sin contaminación.

- Materiales y consumibles para la elaboración de las dosis seminales:

Se utilizó un equipo de baño maría electrónico, agua destilada estéril, dilutor de larga duración-8 días (Fórmula F8 de Medinova-Italia) ,vasos de precipitación, probetas graduadas y matraces Erlenmeyer de 1 litro de capacidad para la preparación de la solución dilutora y dilución del semen, envases de 100 ml de polietileno aptos para este fin, conservadora de semen con termostato visible con rangos de temperatura entre 15 y 18 °C. Asimismo se requirió el uso de agua destilada libre de pirógenos , carga bacteriana prácticamente nula (0–1 UFC/10 mL),que garantiza a su vez estar libre de impurezas y minerales que podrían causar lisis (ruptura) o capacitación prematura del espermatozoide; con una conductividad menor o igual a 5 μ S/cm, y un pH: Entre 5 y 8.

1.2. Materiales para realizar el protocolo de tratamiento y evaluación

- Compuestos a evaluar:

• Heparina sódica:

- PARIPHARM®, solución Inyectable
- Concentración comercial: 5000 UI/mL.
- Relación: 1000 UI $\approx$ 10 mg.
- Fabricante: OQ Pharmaceutical

- **Cafeína anhidra:**

- Polvo fino 100% puro de grado analítico.
- Fabricante; Siegfried PharmaChemikalien Minden GmbH
- Proveedor: Oregon Chem Group Spa
- pH 5.5 - 6.5 (10 g/l, 20 °C)
- Solubilidad (agua) 18.7 g/l (16 °C) - 30.2 g/l (28 °C)
- Peso Molecular 194.19 g/mol

- **Bicarbonato de sodio (NaHCO_3):**

- Solución inyectable al 8.4%
- Fabricante: Laboratorios Unidos S.A. (LUSA)

- **Material de laboratorio:**

Incluyó tubos de ensayo rotulados de 10 ml de capacidad, micropipetas de 0-10 y de 20 a 200 μl respectivamente, frascos de 100 ml, vasos de precipitación de 100 y 500 ml, gradillas y jeringas descartables de 1 y 3 ml. Microscopio óptico, porta objetos y cubreobjetos, baño maría, balanza de analítica de precisión e instrumentos de seguridad e higiene dentro del laboratorio.

- **Software estadístico:** para realizar los análisis estadísticos del estudio, se utilizó el software R v4.5.2.

2. METODOLOGÍA

2.1. Selección y fundamentación del diseño experimental

La presente investigación se estructuró bajo un diseño experimental factorial de tres factores ($3 \times 3 \times 3$) con medidas repetidas en el tiempo y un esquema de bloques completos al azar. Este modelo estadístico se seleccionó con el propósito de evaluar el impacto de tres agentes bioquímicos —heparina, cafeína y bicarbonato de sodio— sobre la funcionalidad espermática en dosis seminales porcinas refrigeradas. La adopción de

un diseño factorial resulta indispensable en sistemas biológicos complejos, ya que permite discriminar no solo los efectos principales de cada compuesto, sino también identificar posibles interacciones sinérgicas o antagónicas entre ellos (53).

2.1.1. Estructura de factores y niveles

Para el análisis de la respuesta espermática, se establecieron los siguientes factores fijos y sus respectivos niveles:

- Factor A (Heparina): 0, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$.
- Factor B (Cafeína): 0, 2,5 y 5 mM.
- Factor C (Bicarbonato de sodio): 0, 15 y 25 mM.

Dichos tratamientos se evaluaron en muestras con diferentes tiempos de conservación (Días 4, 5, 6, 7 y 8 postcolecta), lo que permitió analizar la robustez de los efectos en función de la senescencia celular *in vitro*. Asimismo, se integró un factor intra-sujeto de cinética temporal con dos puntos de corte: T₁₅ (efecto inmediato) y T₆₀ (efecto sostenido), con el fin de monitorizar la persistencia de los cambios inducidos en el metabolismo espermático.

2.1.2. Control de la variabilidad biológica

Si bien existió variabilidad etaria y genética entre los verracos utilizados, dichas condiciones reflejan escenarios reales de producción comercial y centros de procesamiento seminal, para mitigar el sesgo derivado de la variabilidad individual intrínseca, se incorporó un factor de bloqueo aleatorio correspondiente a los verracos donantes ($n = 4$). El bloqueo por individuo permite segregar la varianza atribuible al semental de la varianza residual, incrementando sustancialmente la potencia estadística del modelo y la precisión en la detección de efectos significativos derivados de los tratamientos bioquímicos (54).

2.1.3. Variables dependientes y evaluación funcional

La respuesta fisiológica se cuantificó a través de dos indicadores críticos de la calidad seminal:

- **Motilidad espermática (%):** Debido a la ausencia de sistema automatizado CASA (Computer Assisted Semen Analysis), ideal; y si bien existen protocolos de evaluación usando las cámaras de Neubauer o Bürker que permiten mayor uniformidad del espesor de muestra y mejoran su reproductibilidad, al requerir dilución de la muestra, esta puede afectar la motilidad natural y presentar limitaciones para valoración dinámica de motilidad progresiva rápida, debido al espacio restringido de observación, respectivamente. Por tanto, bajo las condiciones y limitaciones de campo del presente estudio, la evaluación de motilidad se realizó mediante microscopía óptica convencional bajo metodología estandarizada (figura anexa 08).
- **Vigor espermático:** Evaluado mediante una escala ordinal cualitativa basada en la intensidad del movimiento progresivo de los espermatozoides observados al microscopio. Para el presente estudio se utilizó una escala categórica de cuatro niveles (A–D), donde A corresponde a movimiento vigoroso y altamente progresivo, mientras que D representa movimiento débil o escasa progresividad. Esta clasificación fue adaptada de las metodologías clásicas de evaluación de la intensidad del movimiento espermático descritas en la literatura (55,56), las cuales emplean escalas ordinales para caracterizar el vigor o intensidad del movimiento celular (figura anexa 09).

La selección de estas variables se fundamenta en su alta sensibilidad ante modificaciones en el microambiente iónico y su relevancia directa en la predicción del potencial fecundante del semen (57). Este marco metodológico asegura que el

estudio no solo evalúe el rendimiento celular, sino también la dinámica de activación bioquímica inducida por los factores en estudio.

2.1. Determinación del volumen final de las unidades experimentales

Se estandarizó un volumen final de 1 mL por unidad experimental con el objetivo de garantizar la estabilidad fisicoquímica de las muestras, asegurar la precisión en la dosificación de los tratamientos y optimizar el uso del material biológico. Esta decisión metodológica se fundamenta en los siguientes pilares técnicos:

2.2.1. Estabilidad fisiológica y funcional del semen

El mantenimiento de un volumen de 1 ml resulta crítico para preservar la homeostasis del microambiente seminal. Este volumen permite conservar la osmolaridad, el potencial de hidrógeno (pH) y el equilibrio iónico del diluyente, mitigando los efectos deletéreos de una dilución excesiva que podría comprometer la integridad de la membrana plasmática y la funcionalidad mitocondrial (58). La estabilidad proporcionada por este volumen es esencial para la evaluación fidedigna de parámetros funcionales como la motilidad progresiva, el vigor espermático y la respuesta metabólica ante agentes bioquímicos externos.

2.2.2. Precisión analítica y reproducibilidad

Desde una perspectiva micrométrica, trabajar con una unidad de 1 ml facilita la incorporación de alícuotas de tratamiento en rangos de 20 a 100 μ l. Este procedimiento permite el uso de micropipetas estándar de alta precisión, reduciendo significativamente el error aleatorio asociado al pipeteo de volúmenes sub-microlítricos. La exactitud en la adición de los reactivos es un requisito indispensable para garantizar que las concentraciones finales se ajusten rigurosamente al diseño experimental, asegurando así la reproducibilidad de los resultados (59).

2.2.3. Eficiencia experimental y diseño estadístico

Dada la naturaleza del estudio, que emplea un diseño factorial $3 \times 3 \times 3$ con múltiples repeticiones, diversos sementales y tiempos de evaluación (T15 y T60 min), el volumen de 1 ml permite una gestión eficiente del semen diluido. Esta escala micro-experimental posibilita la ejecución de un elevado número de tratamientos a partir de una única colecta seminal sin comprometer la representatividad estadística ni la viabilidad celular (57). Asimismo, este volumen facilita la cinética de transferencia de calor durante la incubación a 37 °C y permite una homogeneización rápida y efectiva antes de la toma de alícuotas para el análisis microscópico.

2.2. Estandarización de soluciones intermedias y precisión experimental

Debido a que las unidades experimentales se establecieron en un volumen final de 1 ml, se determinó la necesidad de preparar soluciones intermedias (stocks) a partir de los reactivos puros. Esta estrategia de dilución en dos etapas se fundamentó en la optimización de la precisión analítica y la estabilidad fisicoquímica de las muestras biológicas.

La selección de concentraciones intermedias, permitió que los volúmenes adicionados oscilaran entre el 2% y el 10% del volumen total de la muestra (50 µl y 100 µl, respectivamente). El uso directo de soluciones altamente concentradas habría requerido la adición de volúmenes inferiores a 10 µl, lo cual incrementa el error aleatorio y la variabilidad experimental debido a las limitaciones de precisión de los instrumentos de micropipeteo (59).

Mantener el volumen del suplemento dentro de este rango técnico asegura la reproducibilidad de los tratamientos y preserva la integridad del medio, evitando alteraciones bruscas en la osmolaridad o la concentración de los componentes basales del

diluyente (57). Este criterio metodológico, orientado a minimizar la incertidumbre asociada al pesaje de cantidades ínfimas y al error de pipeteo, se alinea con los protocolos estandarizados para el análisis de muestras biológicas y procesamiento seminal (60).

La determinación de los volúmenes a adicionar se realizó mediante la relación de dilución:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Donde:

C_i = concentración inicial de la solución madre o intermedia,

V_i = volumen de solución a adicionar,

C_f = concentración final deseada en la muestra,

V_f = volumen final de la unidad experimental.

2.3.1. Solución intermedia de heparina (500 µg/ml)

La suplementación de las unidades experimentales con heparina se estandarizó mediante la preparación previa de una solución stock intermedia de 500 µg/ml. Esta estrategia se adoptó para optimizar la precisión analítica y garantizar que los volúmenes de adición a las muestras de 1ml fueran técnicamente manejables y reproducibles, mitigando el error sistemático asociado al pipeteo de volúmenes ínfimos.

La solución intermedia se obtuvo a partir de heparina comercial con una actividad biológica de 5 000 UI/ml (equivalente a 50 000 µg/ml). Para su elaboración, se realizó una dilución seriada en agua destilada estéril, alcanzando un volumen final de 100 ml. La concentración de este stock (500 µg/ml) fue calculada para permitir la incorporación de las dosis experimentales de 10 y 25 µg/ml, mediante alícuotas de 20 y 50 µg/ml, respectivamente.

El reactivo fue homogeneizado por inversión suave y conservado bajo condiciones de termo conservación ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) hasta su uso. Esta metodología aseguró que el volumen del tratamiento no excediera el 5% del volumen total de la unidad experimental, preservando la estabilidad reológica y el equilibrio iónico del medio seminal sin comprometer la exactitud de la dosis administrada.

2.3.2. Solución intermedia de cafeína (50 mM)

Teniendo en cuenta la solubilidad máxima de la cafeína en agua a temperatura ambiente, se priorizó asegurar una solución completamente homogénea y estable. El protocolo de preparación de soluciones se estandarizó mediante el uso de una solución stock intermediaria de 50 mM. La elección de esta molaridad se fundamentó en la obtención de un factor de dilución (1:20 y 1:10) que permite una dosificación exacta en el volumen final de 1 ml, de las muestras experimentales, garantizando la reproducibilidad de los tratamientos. Para asegurar la precisión en las concentraciones experimentales de 2,5 y 5 mM, se preparó inicialmente una solución madre (stock) de cafeína anhidra ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) a una concentración de 50 mM en agua bidestilada. Esta concentración se seleccionó para optimizar el pesaje del soluto (0.971 g en 100 ml) y permitir la adición de volúmenes de stock manejables (50 y 100 μl), minimizando así el error pipeteo y manteniendo la estabilidad osmótica del medio experimental. El uso de esta solución intermedia permitió reducir la incertidumbre asociada al pesaje de cantidades ínfimas de reactivo sólido.

2.3.3. Estandarización de la suplementación de bicarbonato de sodio (1 mM)

A diferencia de los otros principios activos, la suplementación con bicarbonato de sodio se realizó de manera directa a partir de una solución madre comercial con una concentración de 84 mg/ml (equivalente a 1 M). La elección de esta concentración comercial permitió prescindir de soluciones intermedias, ya que su molaridad es

técnicamente compatible con los volúmenes de adición requeridos para las unidades experimentales de 1 ml.

Para alcanzar las concentraciones finales de 15 mM y 25 mM, se incorporaron alícuotas de 15 y 25 μ l respectivamente. Estos volúmenes se encuentran dentro de los rangos de precisión nominal de las micropipetas de volumen variable utilizadas, garantizando la reproducibilidad de las dosis sin exceder el 2.5% del volumen total de la muestra. Esta mínima tasa de dilución asegura que las propiedades osmóticas y el equilibrio iónico del diluyente seminal se mantengan estables durante la fase de activación bioquímica.

La siguiente tabla de acuerdo a lo consignado líneas arriba, presenta el análisis comparativo de costos y preparación de los compuestos evaluados, considerando presentación comercial, costo de adquisición, cantidad de materia prima empleada para la elaboración de soluciones stock intermedias y costo operativo por unidad experimental estandarizada a un volumen final de 1 mL de cada unidad experimental. Asimismo, se incluye el volumen de solución stock incorporado para alcanzar cada concentración final evaluada.

Tabla 1: Análisis comparativo de costos de preparación de soluciones stock intermedias y costo operativo por unidad experimental (1 mL)

Aditivo	Costo (S/.)	Solución stock	Preparación stock	Conc. final (vol. agregado/ 1 mL)	Costo por unidad experimental 1mL(S/.)
Heparina sódica (Ampolla 5 ml)	25.00	500 µg/ml	1 ml diluido a 100 ml	10 µg/ml (20 µl)	0.001
				25 µg/ml (50 µl)	0.0025
Cafeína anhidra (1 kg polvo analítico)	250.00	50 mM	0.971 g en 100 ml	2.5 Mm (50 µl)	0.00012
				5 mM (100 µl)	0.00024
Bicarbonato de sodio (Ampolla 20 ml)	3.50	1 M comercial	Uso directo	15 mM (15 µl)	0.0026
				25 mM (25 µl)	0.0044

Fuente: Elaboración propia, 2025.

2.3. Matriz de tratamientos y esquema de dosificación volumétrica

Para la ejecución del diseño factorial 3 x 3 x 3, se elaboró una matriz de dosificación detallada que permitió la preparación sistemática de 27 combinaciones experimentales (unidades experimentales). El objetivo de esta matriz fue garantizar que cada muestra mantuviera un volumen final constante de 1 000 µl (1 ml), ajustando proporcionalmente la cantidad de muestra seminal según los volúmenes de los agentes inductores adicionados.

La tabla presentada a continuación detalla la composición exacta de cada tratamiento, especificando la concentración teórica deseada y el volumen real en microlitros (μl) utilizado de cada solución stock (Heparina: $500\mu\text{g/ml}$; Cafeína: 50mM ; Bicarbonato de Sodio: 1nM).

Tabla 2: Matriz de distribución volumétrica para los 27 tratamientos experimentales.

Código	Heparina ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. Hep. (μl)	Cafeína (mM)	Vol. Caf. (μl)	Bicarbonato (mM)	Vol. Bic. (μl)	Semen (μl)
1	0	0	0	0	0	0	1000
2	0	0	0	0	15	15	985
3	0	0	0	0	25	25	975
4	0	0	2.5	50	0	0	950
5	0	0	2.5	50	15	15	935
6	0	0	2.5	50	25	25	925
7	0	0	5	100	0	0	900
8	0	0	5	100	15	15	885
9	0	0	5	100	25	25	875
10	10	20	0	0	0	0	980
11	10	20	0	0	15	15	965
12	10	20	0	0	25	25	955
13	10	20	2.5	50	0	0	930
14	10	20	2.5	50	15	15	915
15	10	20	2.5	50	25	25	905
16	10	20	5	100	0	0	880
17	10	20	5	100	15	15	865
18	10	20	5	100	25	25	855
19	25	50	0	0	0	0	950
20	25	50	0	0	15	15	935
21	25	50	0	0	25	25	925
22	25	50	2.5	50	0	0	900
23	25	50	2.5	50	15	15	885
24	25	50	2.5	50	25	25	875
25	25	50	5	100	0	0	850
26	25	50	5	100	15	15	835
27	25	50	5	100	25	25	825

Fuente: Elaboración propia, 2025.

Como se observa en la tabla, el diseño permitió una evaluación exhaustiva que abarca desde el control absoluto (Tratamiento 1) hasta la combinación máxima de los tres agentes inductores (Tratamiento 27). Esta sistematización aseguró que el "efecto de dilución" fuera controlado rigurosamente, manteniendo una proporción de medio seminal superior al 82.5% en todos los casos, lo que garantiza que los cambios observados sean atribuibles exclusivamente a la acción bioquímica de los factores en estudio y no a variaciones en el volumen final de incubación.

2.4. Caracterización de la muestra biológica y protocolo de evaluación funcional

2.4.1. Selección de los sementales y obtención de la muestra

La investigación se llevó a cabo utilizando dosis seminales procedentes de cuatro verracos (*Sus scrofa* domestica) adultos de línea terminal, seleccionados por su aptitud reproductiva comprobada y edad superior a los 12 meses. Para minimizar el impacto de la variabilidad biológica intrínseca y maximizar la precisión de las comparaciones entre tratamientos, se estableció al animal (verraco) como factor de bloqueo. Esta estrategia permite aislar el efecto de la individualidad de los ejemplares del efecto principal objeto de estudio. Los ejemplares utilizados como factor de bloqueo para controlar la variabilidad biológica individual (genética, edad, condición fisiológica), fueron:

- Verraco 1: Pietrain alemán, 36 meses de edad ("Pietro").
- Verraco 2: Duroc canadiense, 24 meses de edad ("Jor-El").
- Verraco 3: Híbrido trilineal (50% Duroc, 25% Pietrain, 25% Belga blanco), 24 meses de edad ("Salvaje").
- Verraco 4: Belga blanco, 18 meses de edad ("Big Boy").

Las colectas se realizaron bajo protocolos estándar de inseminación artificial. Las evaluaciones se efectuaron durante el periodo de envejecimiento celular in vitro (Días 4 a 8 postcolecta), intervalo crítico para la validación de protocolos de activación metabólica en semen refrigerado (2).

2.4.2. Protocolo de activación térmica y cinética de incubación

Para asegurar una transferencia de calor uniforme y mimetizar las condiciones fisiológicas del tracto reproductivo, las unidades experimentales (1 ml) fueron sometidas a un proceso de incubación en baño maría a 37 °C tras la adición de los tratamientos. La respuesta espermática se monitorizó bajo una cinética temporal de dos puntos de corte:

Evaluación T₁₅: Realizada a los 15 minutos de incubación para determinar el efecto de activación inmediata de los inductores.

Evaluación T₆₀: Realizada a los 60 minutos de incubación para analizar la persistencia del vigor y la estabilidad metabólica celular.

2.4.3. Evaluación microscópica de las unidades experimentales

En cada tiempo de evaluación, se extrajo una alícuota de la muestra incubada y se depositó sobre un portaobjetos precalentado. La observación se realizó en un microscopio óptico equipado con una platina termostática regulada entre 37 °C y 38 °C, eliminando cualquier riesgo de choque térmico (58). El análisis se estandarizó bajo los siguientes criterios:

- Estimación de la motilidad grupal: Mediante un objetivo de 40 aumentos (40X), se determinó el porcentaje de células con movimiento de progresión, clasificándolas en rangos: Muy Bueno (80-100%), Bueno (60-79%), Regular (40-59%) y Malo (<40%).

- Evaluación del vigor espermático: Utilizando el objetivo de 100 aumentos (100X), se adaptó la categorización funcional de la Organización Mundial de la Salud (57), para distinguir cuatro niveles de intensidad:
 - Categoría A (Progresivos rápidos): Desplazamiento lineal veloz y vigoroso.
 - Categoría B (Progresivos lentos): Desplazamiento progresivo con velocidad reducida o trayectoria no rectilínea.
 - Categoría C (No progresivos): Movimiento flagelar detectable (vibración o nado circular) sin desplazamiento efectivo.
 - Categoría D (Inmóviles): Ausencia total de movimiento.

2.4.4. Validación y control de calidad metodológica

La validez interna del estudio se sustentó en la calibración periódica del instrumental y la capacitación técnica del evaluador, factores que permitieron minimizar la subjetividad inherente a las técnicas cualitativas. Estos procedimientos aseguran que las diferencias observadas sean consecuencia directa de la interacción bioquímica de los factores en estudio (heparina, cafeína y bicarbonato) y no de variaciones procedimentales (57)

2.5. Estrategia de recolección de datos

La recolección de datos se efectuó mediante procedimientos estandarizados orientados a garantizar la confiabilidad, reproducibilidad y adecuada trazabilidad de la información obtenida durante la evaluación de las muestras seminales porcinas. Para ello se definieron criterios metodológicos relacionados con la estandarización de las mediciones, el registro sistemático de los datos experimentales y su posterior organización para el análisis estadístico.

2.5.1. Estandarización de las mediciones

Con el propósito de reducir la variabilidad experimental y mejorar la consistencia de las observaciones, todas las evaluaciones microscópicas fueron realizadas por un único operador previamente capacitado en análisis seminal. Esta estrategia permitió minimizar la variabilidad interobservador, particularmente importante en la evaluación de parámetros con cierto componente subjetivo, como la motilidad y el vigor espermático.

Asimismo, durante todo el periodo experimental se empleó el mismo equipamiento de laboratorio (microscopio y material auxiliar), evitando posibles sesgos derivados de diferencias instrumentales o variaciones en la calibración de los equipos.

2.5.2. Registro de los datos

El registro de la información experimental se realizó mediante fichas de control diseñadas específicamente para el estudio, lo que permitió sistematizar la información y asegurar la trazabilidad de cada muestra analizada. En dichas fichas se consignaron los siguientes datos:

- Identificación del verraco donante.
- Identificación de la muestra y código correspondiente.
- Concentración de heparina aplicada ($\mu\text{g/ml}$).
- Concentración de cafeína aplicada (mM).
- Concentración de bicarbonato de sodio aplicada (mM).
- Porcentaje de motilidad espermática a los 15 minutos (T_{15}).
- Categoría de motilidad espermática a T_{15} .
- Vigor espermático a T_{15} .
- Porcentaje de motilidad espermática a los 60 minutos (T_{60}).
- Categoría de motilidad espermática a T_{60} .

- Vigor espermático a T₆₀.

Este sistema de registro permitió documentar tanto la identificación de las muestras como las variables experimentales y los parámetros de respuesta evaluados, facilitando la organización posterior de los datos para su análisis estadístico.

2.5.3. Almacenamiento y organización de los datos

La información obtenida fue inicialmente consignada en tablas de tratamientos diseñadas para registrar ordenadamente los resultados generados durante el desarrollo experimental. Posteriormente, los datos fueron digitalizados en hojas de cálculo y/o software estadístico especializado, con la finalidad de facilitar su procesamiento, análisis y respaldo.

Adicionalmente, se aseguró la trazabilidad de las muestras mediante un sistema de etiquetado que incluyó la identificación del verraco, tratamiento aplicado, código de muestra y tiempo de evaluación, lo cual permitió mantener un control preciso durante todas las fases del estudio y reducir la probabilidad de errores en la asignación de la información experimental.

2.6. Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos a partir de las evaluaciones de motilidad y vigor espermático fueron analizados utilizando el software R v4.5.2 (R Core Team, Viena, Austria). La organización y procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete tidyverse, mientras que el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando los paquetes lme4, lmerTest, emmeans y ordinal.

El experimento se estructuró bajo un diseño factorial $3 \times 3 \times 3$, compuesto por tres concentraciones de heparina (0, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$), tres concentraciones de cafeína (0, 2.5 y 5 mM) y tres concentraciones de bicarbonato de sodio (0, 15 y 25 mM), generando un total de 27 combinaciones experimentales. Cada tratamiento fue evaluado en dos tiempos

de incubación: T15 y T60 (15 y 60 minutos posteriores a la adición de los tratamientos). Las evaluaciones se realizaron durante el periodo de envejecimiento espermático in vitro (D4–D8 postcolecta).

La motilidad espermática (%) fue analizada mediante modelos lineales mixtos, considerando como efectos fijos los factores heparina, cafeína, bicarbonato y tiempo de incubación, así como sus interacciones. El día postcolecta se incluyó como factor adicional para controlar el efecto del envejecimiento espermático, mientras que el identificador de la muestra se incorporó como efecto aleatorio para controlar la variabilidad biológica entre muestras.

Debido a que la motilidad se expresa como porcentaje (0–100%), los datos fueron transformados mediante función logit con el fin de mejorar el cumplimiento de los supuestos del modelo. Posteriormente, las medias estimadas fueron retrotransformadas a escala porcentual para su interpretación.

La significancia de los efectos se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias significativas, las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante medias marginales estimadas (EMMeans) utilizando el paquete emmeans, aplicando el ajuste de Tukey. Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar (SE).

El vigor espermático, evaluado mediante una escala ordinal de cuatro categorías (A–D), fue analizado mediante un modelo logístico ordinal acumulativo utilizando el paquete ordinal. En todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.



CAPÍTULO III

1. RESULTADOS

1.1. Motilidad espermática

La motilidad espermática fue significativamente influenciada por las combinaciones de heparina, cafeína y bicarbonato, así como por el tiempo de incubación (15 y 60 min). En ausencia de bicarbonato (0 mM), la motilidad inicial (T15) se mantuvo elevada en todos los tratamientos, con valores superiores al 82%, sin diferencias significativas entre las concentraciones de heparina y cafeína ($p > 0.05$). Sin embargo, a los 60 min (T60) se observaron diferencias marcadas entre tratamientos. En particular, las combinaciones que incluyeron heparina (10 y 25 $\mu\text{g/mL}$) sin cafeína ni bicarbonato mostraron las mayores motilidades a T60 ($\approx 80\%$), significativamente superiores al control sin heparina ($\approx 35\%$; $p < 0.05$). Por el contrario, la adición de cafeína (2.5 y 5 mM) produjo una marcada reducción de la motilidad a T60, con valores inferiores al 4%.

En presencia de bicarbonato (15 y 25 mM), la motilidad espermática fue extremadamente baja desde el inicio del ensayo, con valores cercanos al 1% a T15 y aproximadamente 0.5% a T60, sin diferencias significativas entre las combinaciones evaluadas ($p > 0.05$). En general, los tratamientos con bicarbonato mostraron motilidades significativamente menores en comparación con aquellos sin bicarbonato ($p < 0.05$). Estos resultados indican que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la suplementación con heparina en ausencia de cafeína y bicarbonato favoreció la estabilidad de la motilidad espermática durante el periodo de incubación, mientras que la presencia de cafeína y especialmente bicarbonato se asoció con una rápida disminución de la motilidad.

Tabla 3: Motilidad espermática (%) a 15 y 60 min según combinaciones de heparina, cafeína y bicarbonato.

Heparina (µg/mL)	Cafeína (mM)	Bicarbonato (mM)	Motilidad T15 (%)	Motilidad T60 (%)
0	0	0	93.2 ± 1.6 b	35.2 ± 5.9 c
10	0	0	93.2 ± 1.6 b	80.3 ± 4.1 d
25	0	0	93.2 ± 1.6 b	80.6 ± 4.0 d
0	2.5	0	90.2 ± 2.3 b	3.8 ± 0.9 b
10	2.5	0	89.6 ± 2.4 b	2.2 ± 0.6 b
25	2.5	0	86.7 ± 3.0 b	2.4 ± 0.6 b
0	5	0	89.3 ± 2.5 b	2.0 ± 0.5 b
10	5	0	86.1 ± 3.1 b	1.4 ± 0.4 ab
25	5	0	82.4 ± 3.8 b	1.1 ± 0.3 ab
0	0	15	1.2 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
10	0	15	1.0 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
25	0	15	1.3 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
0	2.5	15	1.9 ± 0.5 a	0.5 ± 0.1 a
10	2.5	15	1.3 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
25	2.5	15	0.9 ± 0.2 a	0.5 ± 0.1 a
0	5	15	1.0 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
10	5	15	1.0 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
25	5	15	0.9 ± 0.2 a	0.5 ± 0.1 a
0	0	25	1.2 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
10	0	25	1.0 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
25	0	25	1.3 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
0	2.5	25	1.2 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
10	2.5	25	1.3 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
25	2.5	25	0.9 ± 0.2 a	0.5 ± 0.1 a
0	5	25	1.0 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
10	5	25	1.0 ± 0.3 a	0.5 ± 0.1 a
25	5	25	0.9 ± 0.2 a	0.5 ± 0.1 a

Nota: Valores expresados como medias estimadas (EMMeans) ± error estándar (EE). Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La motilidad espermática disminuyó significativamente durante el periodo de envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta). A los 15 minutos de incubación (T15), el mayor valor se registró en el día 4 ($21.9 \pm 1.48\%$), seguido del día 5 ($14.7 \pm 1.08\%$). A partir del día 6 se observó una reducción marcada de la motilidad, con valores inferiores al 7%, sin diferencias significativas entre los días 6, 7 y 8 ($p > 0.05$).

Un patrón similar se observó en la evaluación realizada a los 60 minutos (T60), donde la motilidad disminuyó progresivamente desde $3.5 \pm 0.29\%$ en el día 4 hasta valores cercanos a 1% en los días 6–8. Estos resultados evidencian un deterioro progresivo de la motilidad espermática asociado al envejecimiento postcolecta.

Tabla 4: Motilidad espermática (%) durante el envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta) evaluada a los 15 y 60 minutos.

Día postcolecta	T15 (% $\pm$ EE)	T60 (% $\pm$ EE)
D4	21.9 ± 1.48 c	3.5 ± 0.29 c
D5	14.7 ± 1.08 b	2.1 ± 0.18 b
D6	6.9 ± 0.55 a	0.9 ± 0.08 a
D7	5.6 ± 0.46 a	0.8 ± 0.06 a
D8	5.5 ± 0.45 a	0.7 ± 0.06 a

Nota: Valores expresados como media $\pm$ error estándar (EE). Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre días según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Motilidad espermática durante el envejecimiento in vitro (D4–D8)

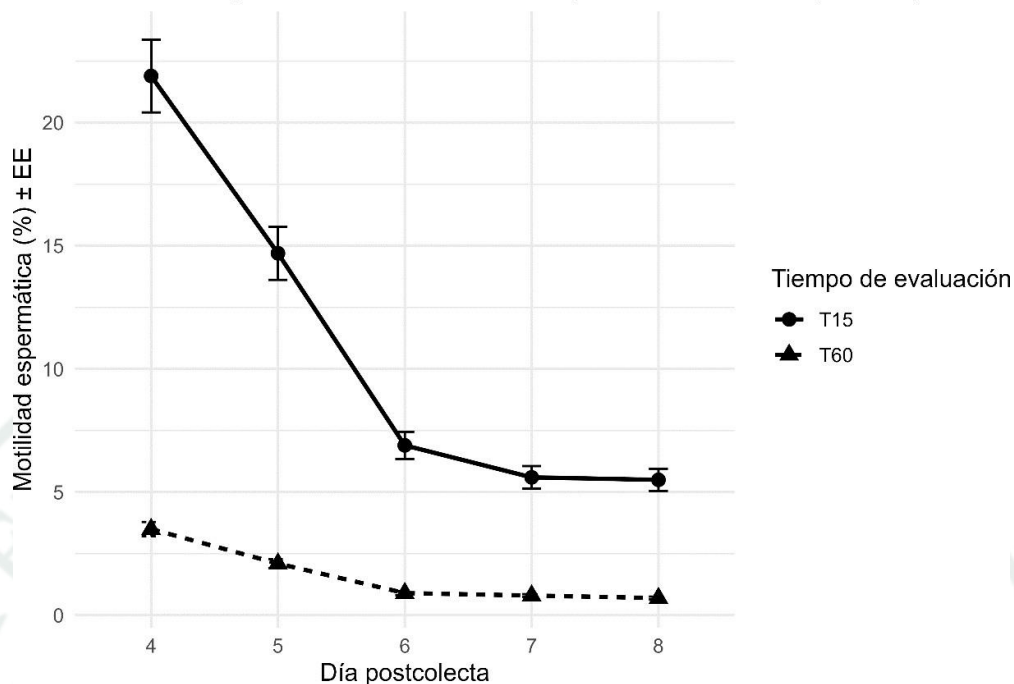


Figura 1. Variación de la motilidad espermática (%) durante el envejecimiento in vitro del semen porcino entre los días 4 y 8 postcolecta. Las evaluaciones se realizaron a los 15 minutos (T15) y 60 minutos (T60) posteriores a la incubación con las soluciones experimentales.

1.2. Vigor espermático

El vigor espermático mostró un deterioro marcado durante el periodo de incubación in vitro. A los 15 minutos posteriores a la adición de los tratamientos (T15), el 26.7% de los espermatozoides presentó un vigor alto (categoría A), mientras que el 48.1% se ubicó en la categoría D. Sin embargo, a los 60 minutos (T60) se observó una disminución notable de la categoría A (5.6%) y un incremento marcado de la categoría D (78.9%), evidenciando una reducción progresiva del vigor espermático con el tiempo de incubación.

Tabla 5: Distribución porcentual del vigor espermático (A–D) en los tiempos de evaluación T15 y T60.

Tiempo	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
T15	26.7	4.3	20.9	48.1
T60	5.6	5.9	9.6	78.9

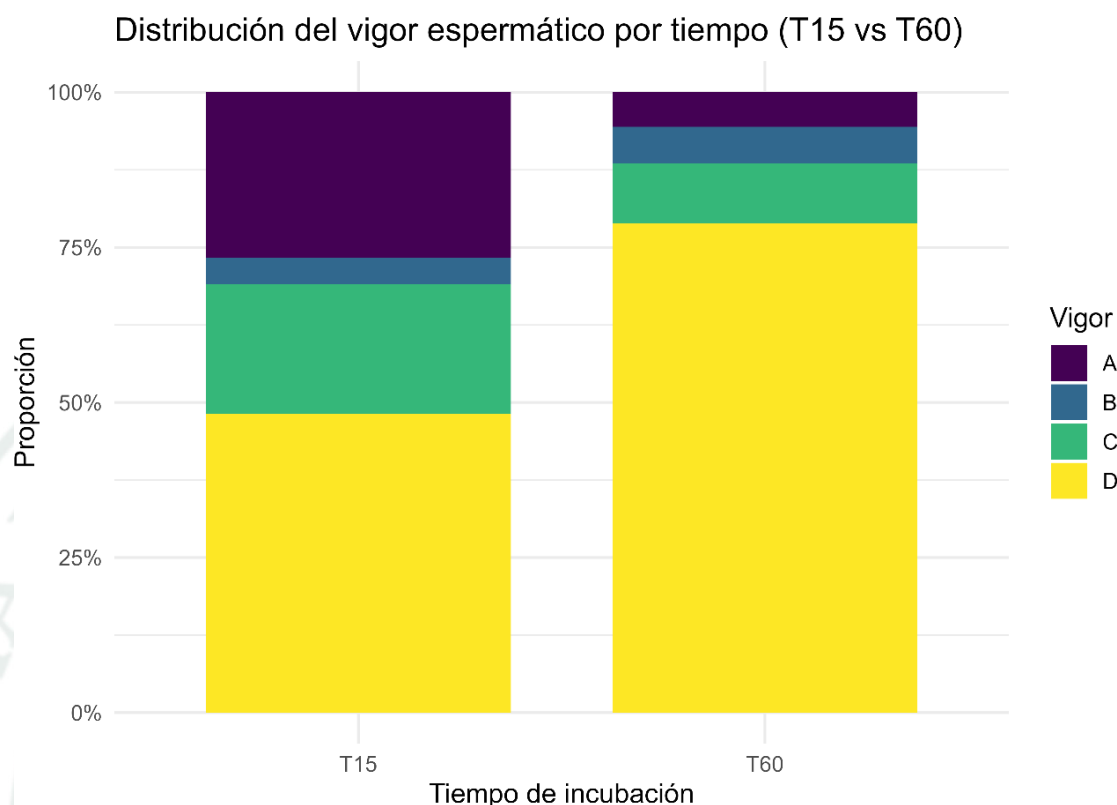


Figura 2. Distribución porcentual de las categorías de vigor espermático (A–D) en los tiempos de evaluación T15 y T60.

Como se observa en la Figura 2, la distribución del vigor espermático se desplazó progresivamente hacia categorías de menor intensidad con el incremento del tiempo de incubación, evidenciándose una reducción de la categoría A y un incremento marcado de la categoría D a los 60 minutos.

El vigor espermático mostró un deterioro progresivo durante el periodo de envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta). En el día 4 se observó una mayor proporción de categorías de mayor vigor (A y B; 18.5% y 5.1%, respectivamente), mientras que la categoría D representó el 45.8%. Conforme avanzó el envejecimiento, la proporción de espermatozoides en la categoría D aumentó de manera sostenida, alcanzando valores superiores al 70% desde el día 6 (D6: 72.2%; D7: 73.6%; D8: 73.1%). Paralelamente, la categoría C disminuyó marcadamente de 30.6% (D4) a valores entre 6.9% y 7.9% (D6–D8), evidenciando una pérdida general del vigor espermático asociada al tiempo postcolecta.

Tabla 6: Distribución porcentual del vigor espermático (A–D) durante el envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta).

Día postcolecta	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
D4	18.5	5.1	30.6	45.8
D5	18.5	5.1	23.6	52.8
D6	15.7	5.1	6.9	72.2
D7	13.9	5.1	7.4	73.6
D8	13.9	5.1	7.9	73.1

Nota: A = vigor muy alto; B = vigor alto; C = vigor moderado; D = vigor bajo o ausente.

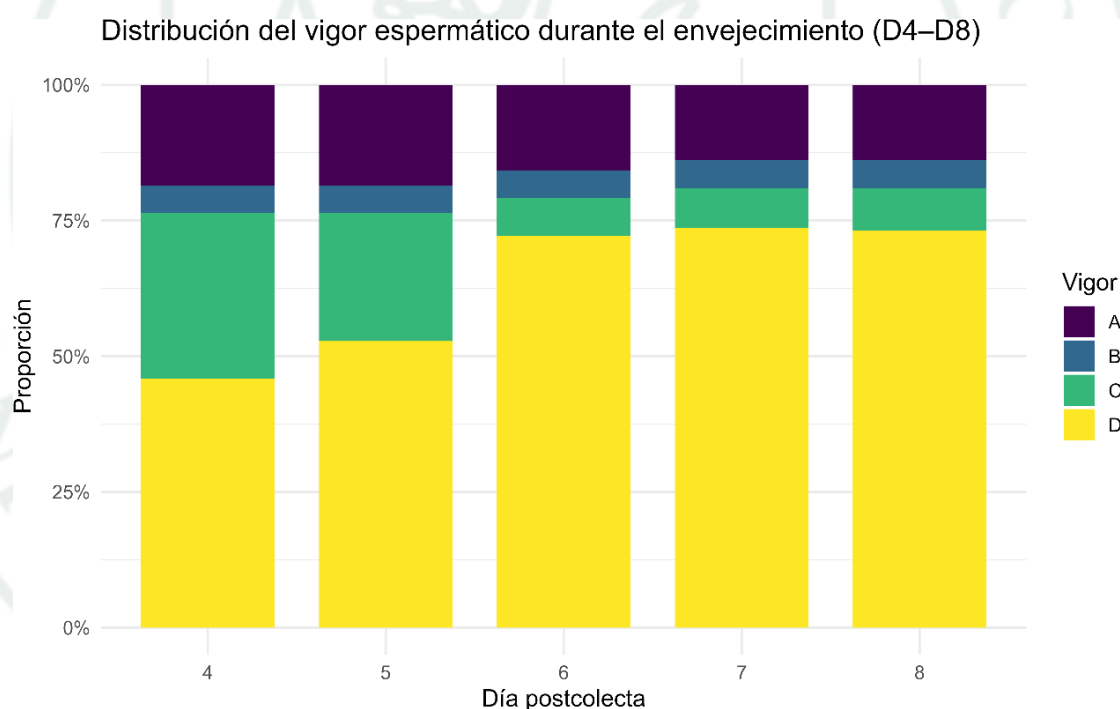


Figura 3. Distribución porcentual de las categorías de vigor espermático (A–D) durante el periodo de envejecimiento in vitro (D4–D8 postcolecta).

El vigor espermático fue evaluado mediante una escala ordinal de cuatro categorías, donde A corresponde a vigor muy alto, B a vigor alto, C a vigor moderado y D a vigor bajo o ausente. Las barras representan la proporción de observaciones registradas en cada categoría de vigor respecto al total de evaluaciones realizadas por día. Se observa

un incremento progresivo de la categoría D y una disminución de las categorías de mayor vigor conforme avanza el periodo postcolecta.

2. DISCUSIÓN

El Bicarbonato de Sodio (25 mM) presentó un coeficiente negativo en el modelo, lo que indica un efecto depresor sobre la motilidad en estas dosis envejecidas. Según Holt & Harrison (43), un exceso de bicarbonato en células con membranas ya fragilizadas por el almacenamiento prolongado (D6-D8) puede alterar el equilibrio osmótico y el pH intracelular, resultando en una disminución de la movilidad si no se equilibra con otros aditivos.

Asimismo, los datos muestran que la Cafeína (5 mM) ejerce el efecto positivo muy marcado en la evaluación inmediata (T15) con una significancia de $P < 0.05$. Esto se alinea con lo expuesto por Bamba & Kojima (39), quienes describen a la cafeína como un activador del metabolismo energético vía AMPc. La cafeína como inhibidor de la fosfodiesterasa, lo que impide la degradación del AMP cíclico (AMPc), por ende, eleva sus niveles y promueve una hiperactivación inmediata de las proteínas quinasas que regulan el batido flagelar, incrementando la intensidad y fuerza del movimiento, sin embargo, este proceso demanda un consumo acelerado de ATP. Según Holt y Harrison (43), la estimulación artificial del metabolismo mediante metilxantinas en espermatozoides porcinos suele derivar en un agotamiento prematuro de las reservas energéticas si el medio no provee sustratos adicionales de recambio rápido, de allí que no logra sostener su efecto en la evaluación a los 60 minutos (T60). post-adición.

A diferencia de la cafeína, cuyo efecto tiende a diluirse con el tiempo, la Heparina (10 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$) mantuvo un efecto positivo y estadísticamente significativo ($P < 0.05$) hasta los 60 minutos (T60). Esta capacidad de sostener el vigor espermático coincide con los hallazgos de Parrish et al. (40) y Dapino (45), sugiriendo que la heparina estabiliza la respuesta funcional de la célula, evitando el agotamiento metabólico rápido tras la reactivación térmica a 37°C. Un hallazgo crítico es que mientras la cafeína tiende a agotarse, la Heparina (en ambas concentraciones) mantiene un efecto positivo significativo y creciente hacia los 60 minutos (T60). A diferencia de lo observado en la motilidad, la Heparina emerge como el factor con el efecto positivo más consistente sobre el vigor en todos los tiempos evaluados ($p < 0.05$). Según Parrish et al. (40) y Dapino (45), la heparina facilita la remoción de proteínas del plasma seminal adheridas

a la membrana, lo que no solo prepara al espermatozoide para la capacitación, sino que "libera" mecánicamente el flagelo para un movimiento más vigoroso y rítmico.

2.1. Limitaciones y alcance aplicativo del estudio:

La presente investigación se desarrolló bajo condiciones reales de campo orientadas a resolver una problemática reproductiva específica en sistemas comerciales de producción porcina tecnificada. Su ejecución se realizó en una empresa replicadora ubicada en la provincia de Moyobamba-San Martín, donde las dosis seminales porcinas son adquiridas desde centros especializados de alta genética localizados en Lima y Arequipa, implicando largos periodos de transporte y exposición a condiciones variables que pueden afectar significativamente la funcionalidad espermática.

En este contexto, el objetivo del estudio no estuvo orientado a evaluar condiciones ideales de laboratorio, sino a diseñar y validar una estrategia técnicamente viable para recuperar o potenciar la funcionalidad fertilizante de células espermáticas viables presentes en dosis seminales refrigeradas sometidas a estrés logístico y almacenamiento prolongado. Esta problemática reviste especial importancia para sistemas productivos alejados de centros de distribución genética, donde la pérdida funcional de semen refrigerado representa una limitante técnica y económica recurrente.

Si bien el número de verracos donantes incluidos fue de cuatro, el diseño experimental contempló una estructura factorial completa de 27 tratamientos ($3 \times 3 \times 3$), evaluados durante cinco tiempos de conservación postcolecta (días 4, 5, 6, 7 y 8), generando un total de 540 unidades experimentales distribuidas entre sementales, tratamientos y tiempos de evaluación. Esta estructura permitió obtener una base experimental robusta, con adecuada representatividad biológica y suficiente poder analítico para evaluar la respuesta funcional de las células espermáticas frente a los compuestos estudiados.

Adicionalmente, la incorporación de los verracos como factor de bloqueo aleatorio dentro del modelo estadístico permitió controlar parcialmente la variabilidad biológica inherente asociada a diferencias individuales entre sementales, aproximando el diseño a condiciones reales de operación utilizadas en programas comerciales de inseminación artificial porcina.

Por tratarse de una investigación aplicada de campo, los resultados obtenidos deben interpretarse dentro del contexto operativo para el cual fueron diseñados,

constituyendo una propuesta tecnológica orientada a optimizar el aprovechamiento de dosis seminales refrigeradas transportadas a largas distancias, especialmente en regiones alejadas de centros de producción genética especializada.



CONCLUSIONES

1. La concentración óptima para maximizar y preservar la motilidad espermática porcina correspondió a la suplementación individual de heparina a 10 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ en ausencia de los otros compuestos; su efecto se asoció a una acción estabilizadora de membrana, permitiendo mantener porcentajes superiores de motilidad respecto a los demás tratamientos evaluados. Por el contrario, las concentraciones de cafeína (2.5 y 5 mM) y de bicarbonato de sodio (15 y 25 mM) resultaron perjudiciales para la funcionalidad espermática.
2. El análisis temporal evidenció que la heparina ejerce un efecto sostenido, manteniendo la motilidad en niveles elevados ($\sim 80\%$) hasta los 60 minutos (T_{60}). En contraste, la cafeína mostró un efecto estimulante transitorio a los 15 minutos (T_{15}) al actuar como inhibidor de la fosfodiesterasa, elevando el AMPc intracelular e induciendo una hiperactivación flagelar. Sin embargo, esta demanda energética provocó un agotamiento prematuro de ATP, haciendo caer la motilidad por debajo del 4% a los 60 minutos. Por su parte, el bicarbonato de sodio desplomó la motilidad de forma inmediata a valores cercanos al 1% en ambos tiempos, debido a que alteró radicalmente el equilibrio del pH superando el rango fisiológico óptimo (6.8–7.4), lo que desestabilizó la membrana celular.
3. Desde el punto de vista aplicativo, los resultados obtenidos sugieren que la suplementación estratégica con heparina podría constituir una alternativa técnicamente viable para programas de inseminación artificial porcina desarrollados en condiciones de campo, particularmente en sistemas productivos que dependen del transporte de dosis seminales refrigeradas desde centros de genética especializados ubicados a grandes distancias. En este contexto, su uso potencial adquiere especial relevancia en granjas replicadoras, donde el valor económico (S/. 0.20 a S/. 0.50 por dosis), asociado al aprovechamiento eficiente de material genético de alto valor justifica la evaluación de tecnologías complementarias orientadas a preservar la funcionalidad fertilizante del semen refrigerado.

RECOMENDACIONES

1. Basado en los resultados obtenidos, se recomienda la suplementación con heparina (en concentraciones finales de 10 a 25 $\mu\text{g/mL}$) en dosis de semen porcino refrigerado. Al ser un insumo de uso clínico, su aplicación es ideal para sistemas especializados de reproducción y multiplicación genética, tales como granjas replicadoras. En estos escenarios, potenciar la funcionalidad espermática resulta técnica y económicamente justificable, especialmente cuando las dosis enfrentan distancias considerables y un transporte prolongado desde los centros de distribución. Su adopción se fundamenta en una alta viabilidad económica y en la capacidad demostrada en este trabajo para sostener los parámetros de motilidad y vigor flagelar frente al envejecimiento in vitro y al estrés por traslado.
2. Asimismo, Se sugiere desarrollar una segunda fase experimental en condiciones de campo para evaluar el impacto real de estos tratamientos sobre la fertilidad de las cerdas. Es fundamental diseñar un protocolo que realice el seguimiento técnico de los animales hasta el diagnóstico de preñez, tasa de parición y tamaño de la camada. Esto permitirá confirmar si la estabilidad espermática lograda por la heparina in vitro se traduce de forma efectiva en un incremento de la eficiencia reproductiva en granja.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Anuario Estadístico de la Producción Pecuaria y Avícola 2023. Anuario. Lima-Perú: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego; 2023. Report No.: Año 7.
2. Jhonson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62(1-3): p. 143-172.
3. Gerrits RJ, Lunney JK, Jhonson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, et al. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*. 2005; 63(2): p. 283-299.
4. Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2010; 56(5): p. 334-348.
5. Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*. 1999; 52(3): p. 447-459.
6. porciNews. Porcinews.com. [Online].; 2020 [cited 2024 marzo 11. Available from: <https://porcinews.com/desempeno-reproductivo-inseminacion-artificial-y-parametros-productivos/?reload=yes>.
7. veterinariadigital.com. veterinaria digital.com. [Online].; 2020 [cited 2024 julio 13. Available from: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/inseminacion-artificial-porcina-reproduccion-eficiente/>.
8. Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*. 2019; 137: p. 2-7.
9. García F, Chiara G, Rodriguez E. Reproductive Biotechnologies Applied to Artificial Insemination in Swine. In <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2089/10.1201/9780367817527> , editor. *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction. Current Trends and Practical Applications for Reproductive Management*. New York: Apple Academy Press; 2020. p. 283-323.
10. bmeditores.mx. bmeditores.mx. [Online].; 2022 [cited 2024 mayo 17. Available from: <https://bmeditores.mx/porcicultura/estimulantes-espermaticos-en-la-inseminacion-artificial-porcina/>.
11. Velarde Vilela JL. Mejoramiento genético en animales domésticos Mexico: Macro; 2020.
12. Hafez E, Hafez B. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

13. García Vásquez F, Luongo C, Garrappa G, Rodriguez E. Researchgate.net. [Online].; 2020 [cited 2024 noviembre 15. Available from: https://www.researchgate.net/publication/343836088_Reproductive_Biotechnologies_Applied_to_Artificial_Insemination_in_Swine.
14. Velásquez Vergara C. repositorio.unjfsc.edu.pe. [Online]. Available from: <https://repositorio.unjfsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/1562/FACTORES%20QUE%20INFLUYEN%20EN%20LA%20CALIDAD%20DE%20SEMENAL%20DEL%20VERRACO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
15. Kondracki S GK. Analysis of Factors of Variation in Characteristics of Boar Ejaculates. *Animals*. 2025 Jul 11; 15(14): p. 2043.
16. Pallas R. Manual de inseminación artificial porcina KUBUS. 4th ed. SA K, editor. Barcelona: Dr Herriot SL; 2021.
17. porciNews. Porcinews. [Online].; 2020 [cited 2025 febrero 17. Available from: <https://porcinews.com/la-importancia-de-la-seleccion-y-el-manejo-del-verraco/>.
18. Dominiek M, Lopez Rodriguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A. Artificial insemination in pigs. In Manafi M, editor. *Artificial Insemination in Farm Animals*. Croacia: Intech Open; 2011. p. 79-94.
19. Hansen C, Rodríguez-Martínez H. Semen collection, processing, and AI in pigs. In PJ C, SP L, editors. *Animal Andrology: Theories and Applications* 1st ed. Oxford: Cabi; 2014. p. 292-309.
20. Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, et al. The physiological roles of the boar ejaculate. In Adam J. Ziecik HRMJLV, editor. *Control of Pig Reproduction VIII. Proceedings of the Eighth International Conference on Pig Reproduction*. Alberta: Nottingham University Press; 2009. p. 1 -21.
21. Sanchez M, Trujillo ME, Mota D, Roldán P, Martínez R, Orozco H, et al. <http://bmeditores.mx>. [Online].; 2018 [cited 2024 diciembre 1. Available from: <https://bmeditores.mx/porcicultura/elaboracion-de-dosis-de-semen-porcino-control-de-calidad-1802/>.
22. Kubus Lab, S.A. <https://www.3tres3.com>. [Online].; 2025 [cited 2024 diciembre 1. Available from: <https://www.3tres3.com/latam/guia333/empresas/kubus-lab-sa/posts/4161>.
23. Yañez WF. Estudio de la selección espermática en el tracto genital de la hembra basado en la morfometría del espermatozoide porcino. Trabajo de titulación. Riobamba-Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de ciencias pecuarias; 2015.
24. Vyt P. Examination and storage of liquid porcine semen. Thesis to obtain the academic degree of Doctor of Veterinary Science (PhD). Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine; 2007.

25. Cuenca M, Avellaneda J. Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. REDVET - Revista electrónica de Veterinaria. 2017 septiembre; 18(9).
26. Departamento Técnico de Magapor, S.L. magapor.com. [Online].; 2019 [cited 2024 noviembre 12. Available from: <https://magapor.com/sala-prensa/consejos-para-una-correcta-dilucion-i/>.
27. Minitube. minitube.com. [Online].; 2021 [cited 2024 noviembre 10. Available from: <https://www.minitube.com/catalog/es/header-navigation/temas-de-interes/eleccin-del-diluyente-3923/>.
28. Rugele sA, Pérez B, Romero H. Dilución y conservación del semen porcino en refrigeración. Revista Colombiana de Reproducción Animal. 2013; 6(2).
29. Departamento Técnico de Magapor SL. Magapor.com. [Online].; 2019 [cited 2024 noviembre 12. Available from: <https://magapor.com/sala-prensa/consejos-para-una-correcta-dilucion-iii/>.
30. 3tres3. 3tres3.com. [Online].; 2007 [cited 2024 julio 2. Available from: https://www.3tres3.com/articulos/la-dilucion-y-la-conservacion-del-semen_4032/.
31. Hidalgo DM. Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. Tesis doctoral. Extremadura: Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria departamento de medicina animal; 2013.
32. Griveau, J. F & Lannou, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. International Journal of Andrology. 1997; 20: p. 61-69.
33. 3tres3. 3tres3.com. [Online].; 2021 [cited 2024 julio 3. Available from: https://www.3tres3.com/latam/articulos/caracteristicas-de-las-dosis-de-semen-del-verraco_12535/.
34. 3tres3. 3tres3.com. [Online].; 2007 [cited 2024 junio 20. Available from: https://www.3tres3.com/articulos/la-inseminacion-de-la-cerda_4033/.
35. Suarez Usbeck A, Mitjana Nierín O, Bonastre C, Falceto Recio V, Tejedor MT, Moll D, et al. anaporc. [Online].; 2020 [cited 2024 abril 3. Available from: <https://www.archivo-anaporc.com/2020/01/18/evaluaci%C3%B3n-de-la-inseminaci%C3%B3n-artificial-poscervical-vs-cervical-en-los-par%C3%A1metros-reproductivos/>.
36. Sherrie C. Swine reproduction for nonswine practitioners. Part 1 Reproductive physiology and management of the breeding herd. Clinicaltheriogenology. 2022 septiembre; 14(3).
37. Soriano übeda C, García Vásquez FA, Matás C. The journey of the porcine spermatozoa from its origin to the fertilization site: The road in vivo vs in vitro. In <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2089/10.1201/9780367817527> , editor. Biotechnologies applied to animal reproduction: Current trends and practical application for reproductive managment. 1eds. New York: Apple Academy Press; 2020. p. 247-282.

38. Risopatrón J, Catalán S, Sánchez NS&R. redalyc.org. [Online].; 2005 [cited 2024 marzo 12. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95915607.pdf>.
39. Bamba K, Kojima Y. <https://www.cabidigitallibrary.org/>. [Online].; 1981 [cited 2024 noviembre 2. Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19800152311>.
40. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First N. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. *Biology of Reproduction*. 1988; 38(5): p. 1171–1180.
41. Sánchez J, Gonzales J, Illera MJ, Lorenzo PL, Oresanz J. <https://academic.oup.com>. [Online].; 1996 [cited 2024 octubre 30. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/abstract/55/4/860/2760553?redirectedFrom=PDF>.
42. Pereira RJ, Tuli RK, Holtz W, Wallenhorst S. <https://www.sciencedirect.com>. [Online].; 2000 [cited 2024 noviembre 25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X0000340X?via%3Dihub>.
43. Holt WV, Harrison RA. <https://onlinelibrary.wiley.com/>. [Online].; 2002 [cited 2024 noviembre 15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02279.x>.
44. Salgado R, Aguilar L&GC. Efecto de la heparina y la concentración espermática sobre la tasa de fertilización in vitro de ovocitos bovinos. *Zootecnia Tropical*. 2005;; p. 23(1), 1-11.
45. Dapino DG. RepHipUNR. [Online].; 2010 [cited 2024 abril 10. Available from: <https://rephip.unr.edu.ar/server/api/core/bitstreams/9ce0d3c1-4a99-4a62-bac1-c71865d4a0b0/content>.
46. Lee E. e-jarb.org. [Online].; 2008 [cited 2024 noviembre 10. Available from: <https://www.e-jarb.org/journal/view.html?uid=446&vmd=Full#n>.
47. Borges MM. <http://repositorio.ufla.br>. [Online].; 2012 [cited 2024 noviembre 15. Available from: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/536/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Adi%C3%A7%C3%A3o%20de%20cafe%C3%ADna%20ao%20s%C3%AAden%20su%C3%ADno%20resfriado%20ou%20descongelado.pdf>.
48. Nabavi N, Todehdeghhan F, Shiravi A. Effect of caffeine on motility and vitality of sperm and in vitro fertilization of outbreed mouse in T6 and M16 in vitro fertilization of outbreed mouse in T6 and M16. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2013 septiembre; 11(9): p. 741-746.
49. Soriano-Úbeda C, Romero J, Matás C, Visconti P, García F. springer.com/. [Online].; 2019 [cited 2024 noviembre 8. Available from: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-019-0324-y>.

50. De Mercado E, Tomas C, Gomez E. researchgate.net. [Online].; 2020 [cited 2024 noviembre 10. Available from: https://www.researchgate.net/publication/346891244_Improvement_of_the_motility_of_boar_sperm_after_cryopreservation.
51. Umezu K, Kurata S, Hara K, Tanemura K. <https://www.sciencedirect.com/>. [Online].; 2021 [cited 2024 noviembre 20. Available from: <https://pdf.sciencedirectassets.com/272308/1-s2.0-S0006291X21X00241/1-s2.0-S0006291X21008445/am.pdf?X-Amz-SecurityToken=IQoJb3JpZ2luX2VjEGgaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIQD2XEhHk81dDA%2FfqIRAdcYG6zMLI0cU1bQrmjMU0aJCwwIgCL8xzZQFY2KXHtTulfuOqq%2FlfdU6BMX1jKI97MTxol>.
52. Halo M, Tirpak F, Massá M. <https://akjournals.com/>. [Online].; 2022 [cited 2024 noviembre 20. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/004/70/2/article-p143.xml>.
53. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments (9na ed.): Jhon Wiley & Sons; 2017.
54. Zar JH. Biostatistical Analysis (5ta ed.): Pearson Education; 2010.
55. Oberlender G, Murgas LSD, Zangeronimo MG, Silva AC, Pereira LJ, Muzzi RAL. <https://www.scielo.cl/>. [Online].; 2012. Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301732X2012000200016&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
56. Ramirez-López CJ, Barros E, Vidigal PMP, Okano DS, Rodrigues JND, Gomes LL, et al. <https://www.mdpi.com/>. [Online]. Relative Abundance of Spermadhesin-1 in the Seminal Plasma of Young Nellore Bulls Is in Agreement with Reproductive Parameters; 2023. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-7381/10/10/610>.
57. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and procesing of human semen (6ta ed.): World Health Organization; 2021.
58. Maxwell WM, Jhonson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the "dilution effect" revisited. Reproduction, Fertility and Development. 1999;; p. 11(4), 223-234. [doi.org](http://dx.doi.org/10.1071/RD99011).
59. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra ed.): Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 2001.
60. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Currente Protocols in Molecular Biology: Jonh Wiley & Sons; 2002.



ANEXOS

Anexo 1

Tabla 01: Parámetros de la evaluación seminal de los verracos donantes

Verraco	Volumen de eyaculado-fase espermática (mL)	Concentración espermática (conteo en Cámara de Neubauer- 10^6 esp/mL)	% Viabilidad espermática (Tinción vital Eosina-Nigrosina)
01	200	180	90
02	150	510	95
03	150	170	91
04	180	410	93



Figura 01: Verraco 01-Pietro (Pietrain alemán)



Figura 02: Verraco 02- JorEl (Duroc)

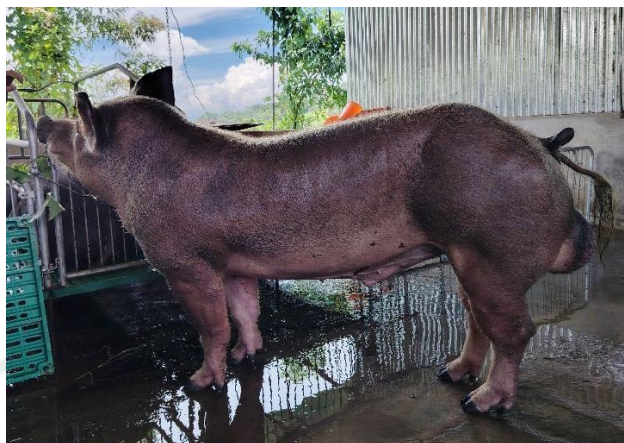


Figura 03: Verraco 03-Salvaje(Trilinea)



Figura 04: Verraco 04- Big Boy (Blanco Belga)



Figura 05: Medición de volúmenes de eyaculados

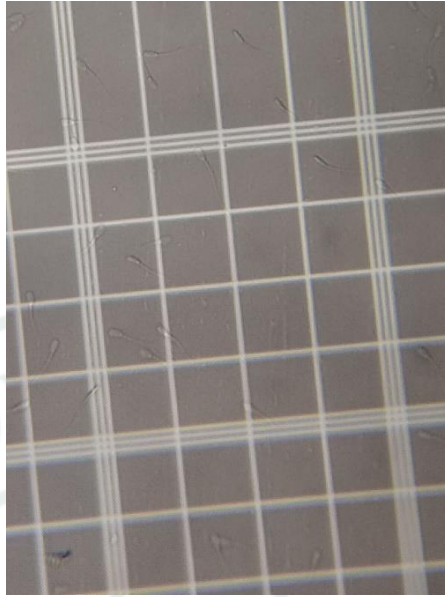
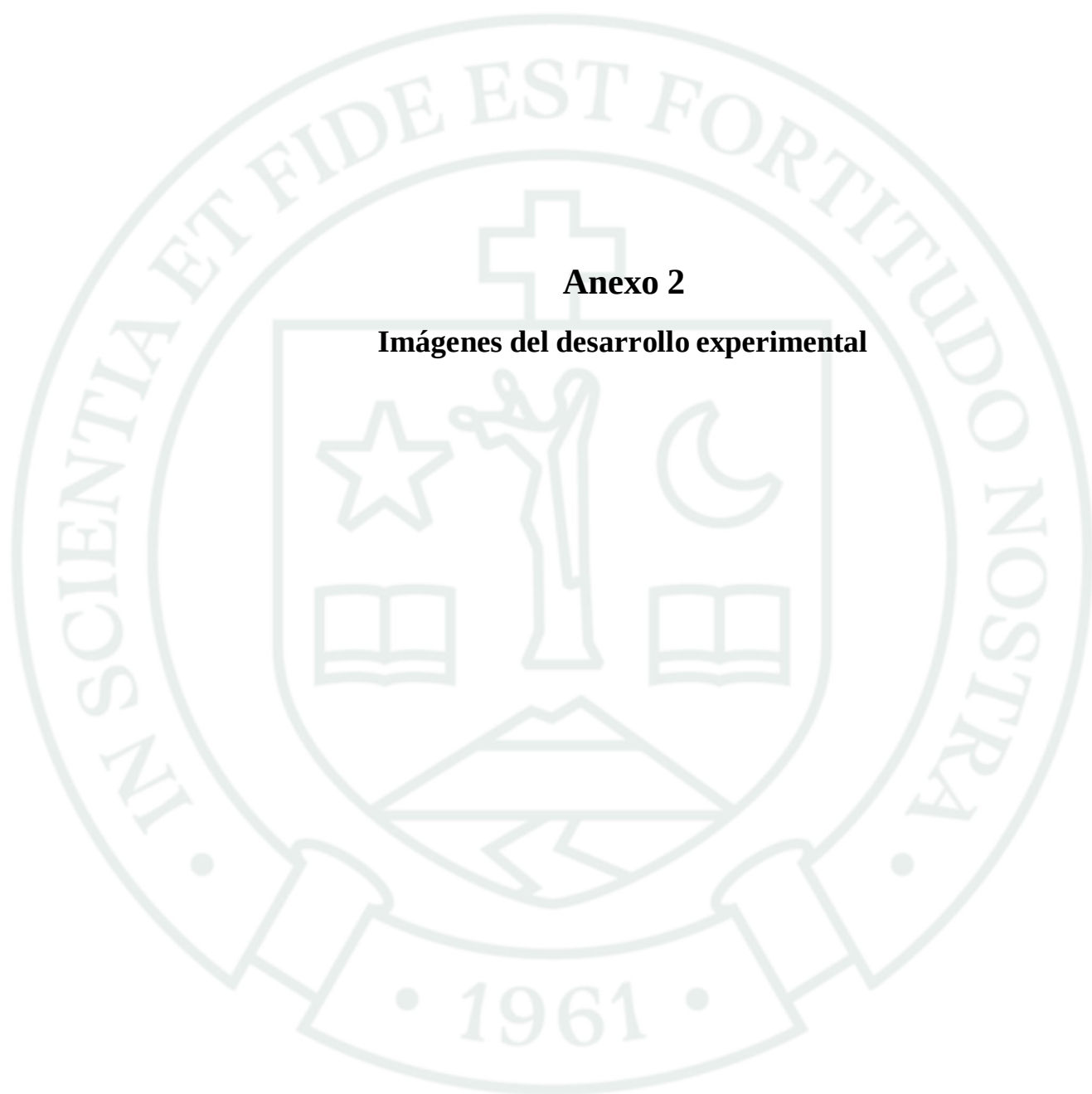


Figura 06: Conteo espermático en Cámara de Neubauer



Figura 07: Tinción vital Eosina Nigrosina



Anexo 2

Imágenes del desarrollo experimental

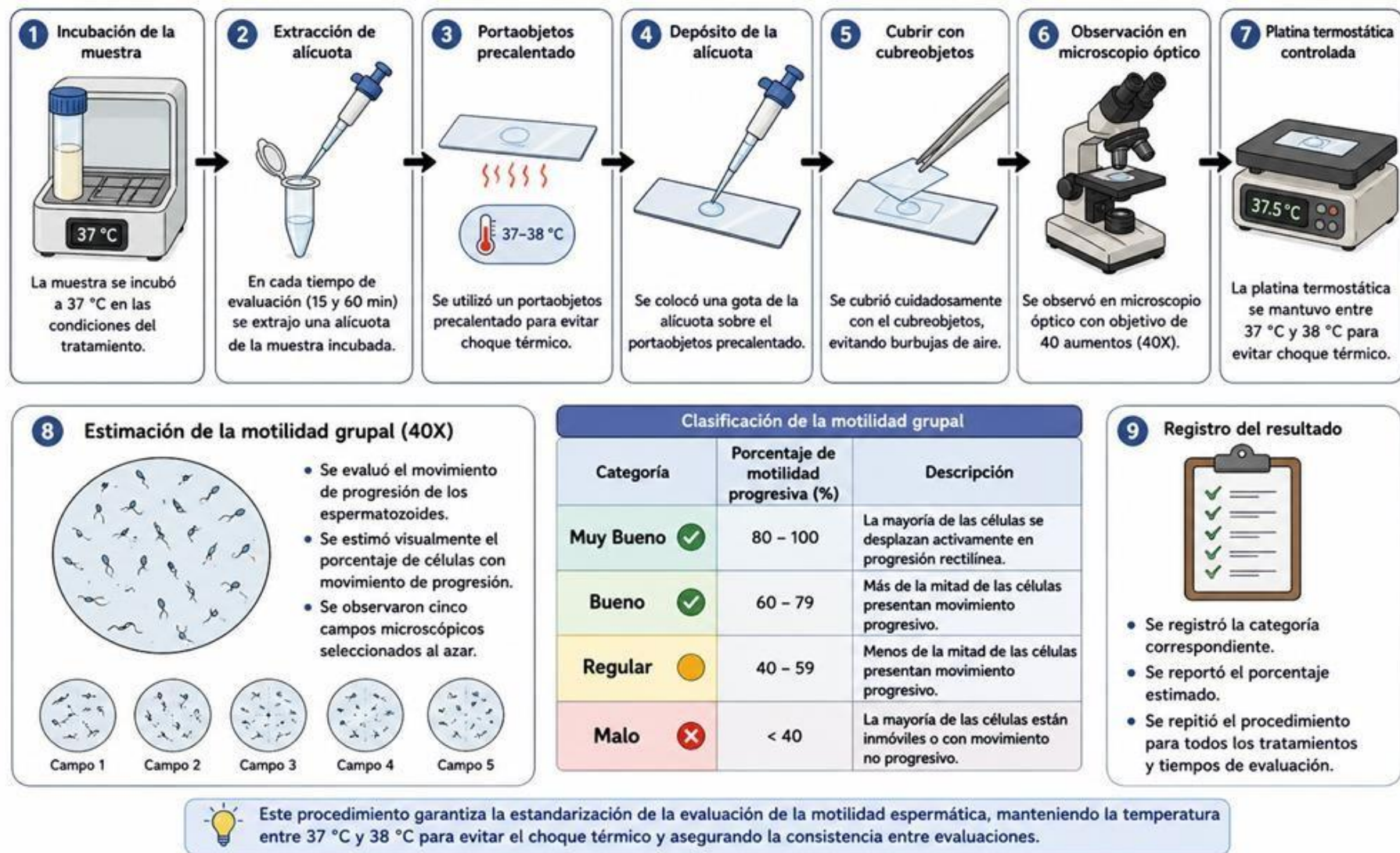


Figura 08. Procedimiento para evaluación de motilidad espermática, mediante microscopía óptica convencional (elaboración propia).

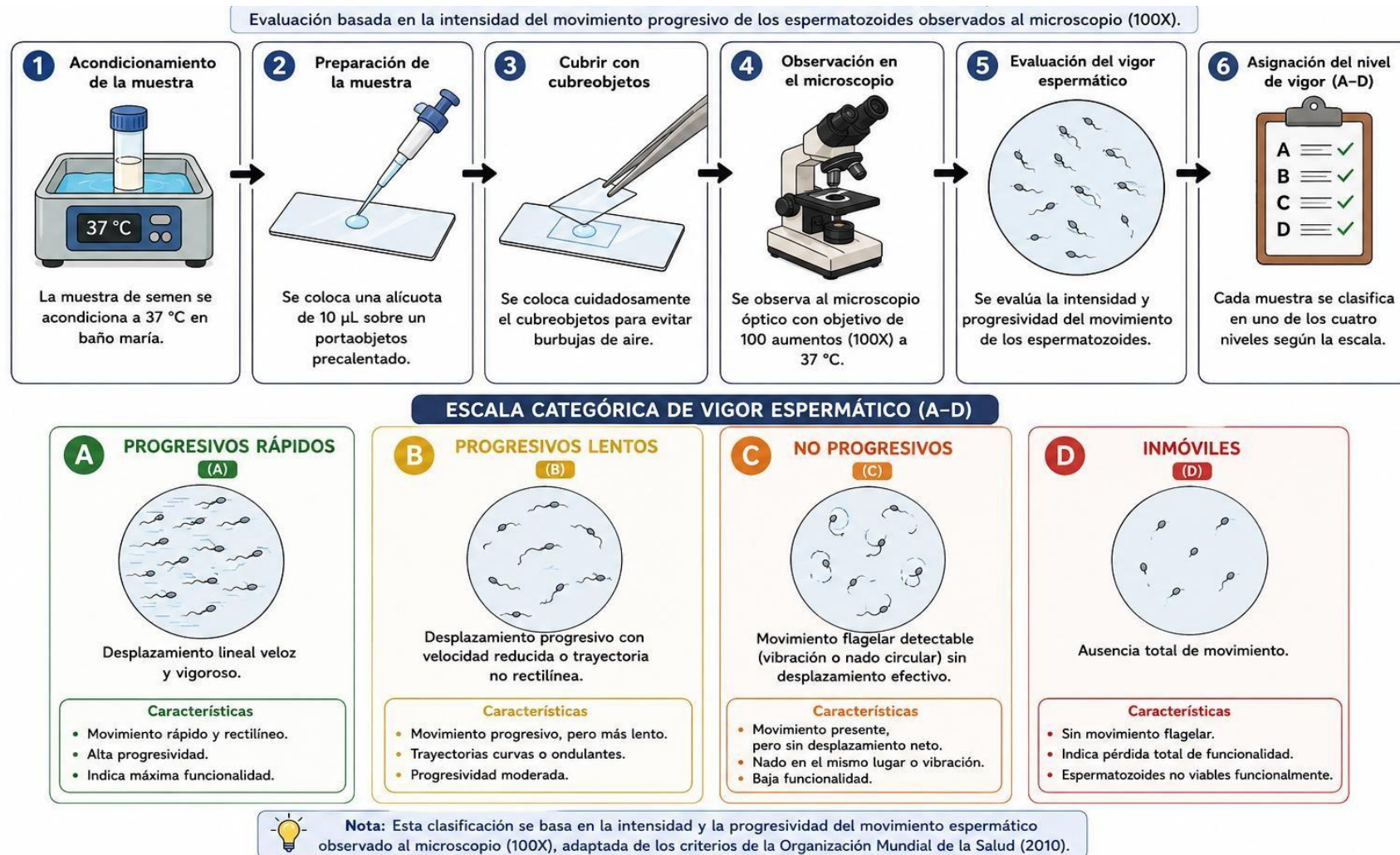


Figura 09. Evaluación del vigor espermático, escala ordinal cualitativa A-D (elaboración propia)



Figura 10: Cafeína Anhidra 100% pura (+ stock)

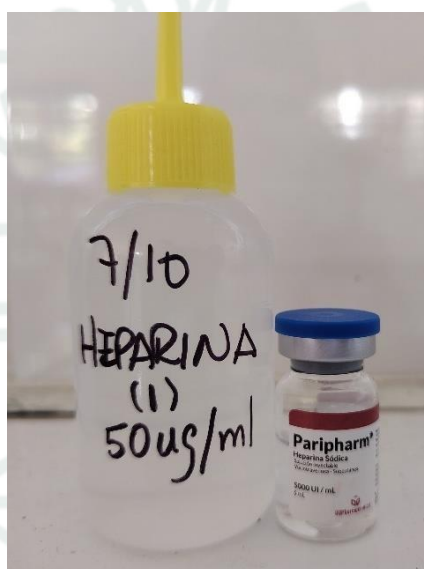


Figura 11: Heparina sódica 5000 UI/mL(+ stock)

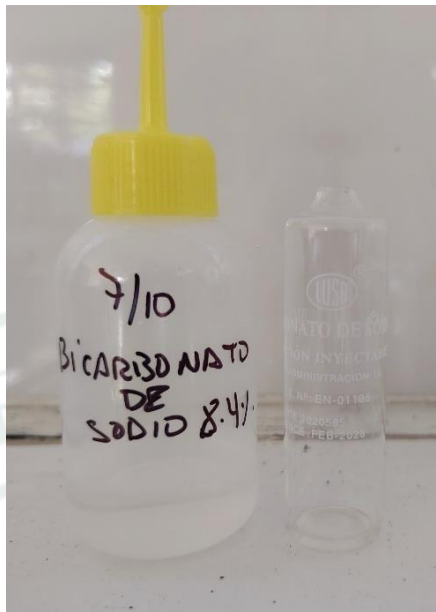


Figura 12: Bicarbonato de sodio 8.4 % (+ stock)

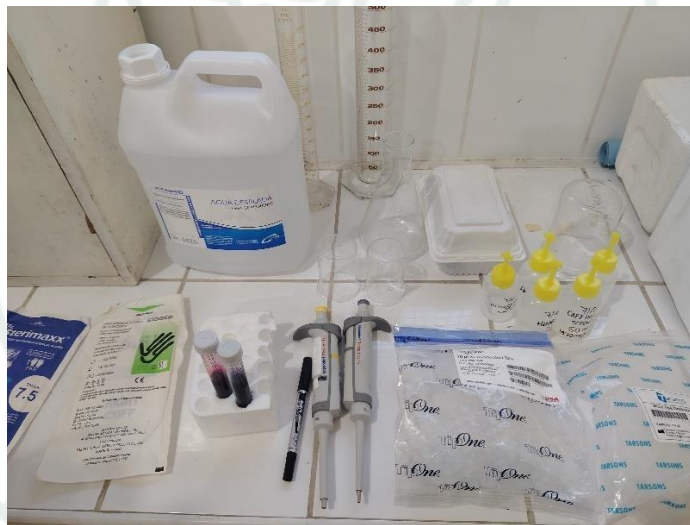


Figura 13: Insumos de laboratorio (1)



Figura 14: Insumos de laboratorio (2)

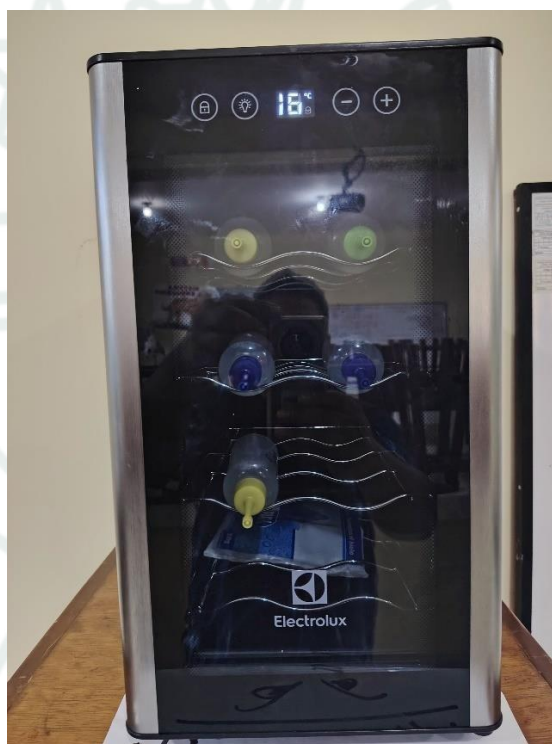


Figura 15: conservadora de muestras



Figura 16: preparación de stock de cafeina

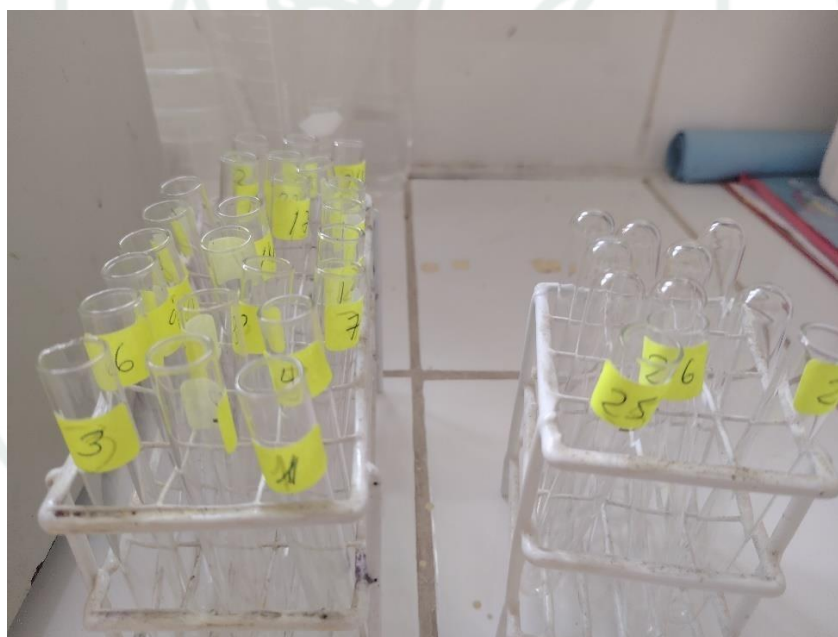


Figura 17: etiquetado de la batería de 27 muestras por verraco/día



Figura 18: dosificación de unidades experimentales (1)



Figura 19: dosificación de unidades experimentales (2)



Figura 20: incubación de unidades experimentales (1)



Figura 21: lectura(observación) de las unidades experimentales (1)



Figura 22: lectura(observación) de las unidades experimentales (2)



Figura 23: lectura(observación) de las unidades experimentales (3)