

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO BAJO EL EFECTO  
DE DOS DILUYENTES EN LA GRANJA PORCÍCOLA VILLA ALEJANDRA**

**JERSON ADOLFO ESTUPIÑAN MENDEZ  
MONICA JINETH PALACIO SILVA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
INSTITUTO DE PROYECCIÓN REGIONAL Y EDUCACIÓN A DISTANCIA  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
MÁLAGA  
2016**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO BAJO EL EFECTO  
DE DOS DILUYENTES EN LA GRANJA PORCÍCOLA VILLA ALEJANDRA**

**JERSON ADOLFO ESTUPIÑAN MENDEZ  
MONICA JINETH PALACIO SILVA**

**Trabajo de Grado para optar el título de  
Zootecnista**

**Director  
RICARDO MORENO JEREZ  
Médico Veterinario Esp.; MSc (C)**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
INSTITUTO DE PROYECCIÓN REGIONAL Y EDUCACIÓN A DISTANCIA  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
MÁLAGA  
2016**

## **DEDICATORIA**

Con sacrificio puede que logres poco, pero sin sacrificio es seguro que no lograras nada. Anónimo

A Dios, por permitirnos alcanzar este logro y ser la guía del camino que transitamos. A nuestros padres y hermanos por el esfuerzo, sacrificio y su apoyo incondicional. A nuestro hijo Julián Leonardo por ser la motivación que encamina siempre nuestros esfuerzos

**Mónica y Jerson**

## **AGRADECIMIENTOS**

Expresamos de manera sincera nuestros agradecimientos a nuestro director y amigo RICARDO MORENO JEREZ Médico Veterinario Esp.; MSc (C), docente UIS, por su acompañamiento, orientación y constante seguimiento en esta etapa de nuestra formación.

A FALLON YAMILE RIAÑO JIMENEZ, M. Sc. Zootecnista, docente UIS, quien de manera paciente y con la mejor disposición asesoro el desarrollo de nuestra investigación

Al Personal docente del programa de Zootecnia, por compartir sus conocimientos y su amistad, por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de nuestra formación.

A la granja porcicola Villa Alejandra por abrir sus puertas a nosotros para desarrollar esta investigación.

A la Universidad Industrial de Santander Sede Málaga, su personal administrativo, directivo y docente, por el acompañamiento que nos brindaron en este camino de formación profesional

A todas aquellas personas que nos brindaron una mano amiga en los momentos de dificultad y a quienes hicieron aportes para la culminación de esta meta.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag	
<b>1</b>	<b>PROBLEMA</b>	19
1.1	DESCRIPCION DEL PROBLEMA	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACION</b>	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	22
3.1	OBJETIVO GENERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>4</b>	<b>MARCO REFERENCIAL</b>	23
4.1	MARCO TEORICO	23
4.1.1	Inseminación Artificial en porcinos	23
4.1.2	Desarrollo de la Inseminación Artificial en porcinos	23
4.1.3	Diluyentes espermáticos	24
4.1.3.1	Función de los diluyentes	25
4.1.3.2	Clases de diluyentes	26
4.1.3.3	Diluyentes y sus características de composición	27
4.1.4	Características del semen porcino	29
4.1.5	Factores de fecundidad relacionados con el macho	29
4.1.5.1	Genética	29

4.1.5.2	Edad (biológica sexual)	30
4.1.5.3	Peso vivo	30
4.1.5.4	Estado sanitario	30
4.1.5.5	Condiciones ambientales	31
4.1.5.6	Manejo	31
4.1.6	Evaluación seminal	32
4.2	MARCO HISTORICO	32
4.2.1	Evaluación de calidad seminal	32
4.2.2	Pruebas de respuesta osmótica	34
4.2.2.1	Pruebas de hinchamiento osmótico	34
4.2.2.2	Test de resistencia osmótica (ORT)	35
4.2.2.3	HRT Test	35
4.3	MARCO LEGAL	35
4.3.1	Del control y vigilancia del material con destino a la reproducción animal	35
4.3.2	Del recaudo de la cuota de fomento	36
4.3.3	Del control de la cadena cárnica porcícola	36
4.3.4	De la erradicación de la peste porcina clásica	37
4.4	MARCO CONCEPTUAL	37
5	<b>DISEÑO METODOLOGICO</b>	38
5.1	LOCALIZACION	38

5.2	<b>METODOLOGIA</b>	38
5.2.1	Primera etapa. Fase de campo o experimental	38
5.2.1.1	Colección del material seminal	38
5.2.1.2	Valoración de calidad del semen fresco	39
5.2.1.3	Descripción de los tratamientos	44
5.2.1.4	Valoración de calidad del semen diluido	46
5.2.1.5	Almacenamiento de las muestras	47
5.2.2	Segunda etapa. Fase de análisis	47
5.2.2.1	Pruebas de valoración de calidad espermática	47
5.2.2.2	Diseño estadístico	48
6	<b>RESULTADOS ANALISIS Y DISCUSION</b>	49
6.1	<b>PRUEBAS DE VALORACIÓN ESPERMÁTICA DEL SEMEN FRESCO</b>	49
6.1.1	Variables macroscópicas	49
6.1.1.1	Color	49
6.1.1.2	Olor	50
6.1.1.3	Volumen	50
6.1.1.4	Ph	51
6.1.2	Variables macroscópicas	52
6.1.2.1	Motilidad	52
6.1.2.2	Tipo de movimiento	53
6.1.2.3	Aglutinaciones	54
6.1.2.4	Morfología	55

6.1.2.5	Concentración	56
6.1.2.6	Test hiposmótico (HOST)	57
6.2	PRUEBAS DE VALORACION ESPERMATICA DEL SEMEN DILUIDO	58
6.2.1	Valoraciones microscópicas	58
6.2.1.1	Motilidad semen diluido	58
6.2.1.2	Tipo de movimiento	59
6.2.1.3	Aglutinaciones	60
6.2.1.4	Morfología	61
6.2.1.5	Test hiposmótico (HOST)	63
6.3	DINÁMICA DE REFRIGERACIÓN Y ACLIMATACIÓN DELAS MUESTRAS	65
6.4	PROTOCOLOS ESTABLECIDOS PARA EL MANEJO ADECUADO DEL MATERIAL SEMINAL	66
6.4.1	Protocolo de ingreso al laboratorio	66
6.4.2	Protocolo de manejo del verraco	67
6.4.3	Protocolo de manejo y dilución del semen	67
7	<b>CONCLUSIONES</b>	68
8	<b>RECOMENDACIONES</b>	70
	BIBLIOGRAFIA	72

## LISTA DE FIGURAS

		Pag
<b>Figura 1</b>	Procedimiento de colección del semen	39
<b>Figura 2</b>	Valoración macroscópica del eyaculado	40
<b>Figura 3</b>	Valoración de concentración BURKER	42
<b>Figura 4</b>	Procedimiento test hiposmótico (HOST)	43
<b>Figura 5</b>	Procedimiento de dilución de semen en los tratamientos	46
<b>Figura 6</b>	Alícuotas tomadas de los tratamientos	46
<b>Figura 7</b>	Volumen del eyaculado en ml	51
<b>Figura 8</b>	Valores de pH de los eyaculados	51
<b>Figura 9</b>	Porcentaje de motilidad del semen fresco	53
<b>Figura 10</b>	Tipo de movimiento del eyaculado	54
<b>Figura 11</b>	Aglutinaciones en el eyaculado	55
<b>Figura 12</b>	Morfología espermática	56
<b>Figura 13</b>	Concentración espermática por ml	56
<b>Figura 14</b>	Porcentaje de espermatozoides inviables- Test HOST	57
<b>Figura 15</b>	Motilidad espermática del semen diluido	58
<b>Figura 16</b>	Promedio de motilidad tratamiento / cerdo	59
<b>Figura 17</b>	Tipo de movimiento tratamiento / cerdo	59
<b>Figura 18</b>	Tipo de movimiento de semen diluido	60
<b>Figura 19</b>	Aglutinaciones tratamiento cerdo	61

<b>Figura 20</b>	Aglutinaciones del semen diluido	<b>61</b>
<b>Figura 21</b>	Morfología por tratamiento	<b>62</b>
<b>Figura 22</b>	Morfología semen diluido	<b>62</b>
<b>Figura 23</b>	Test hiposmótico (HOST) por tratamiento	<b>63</b>
<b>Figura 24</b>	Test hiposmótico (HOST) de semen diluido	<b>64</b>
<b>Figura 25</b>	Dinámica de refrigeración de muestras	<b>65</b>
<b>Figura 26</b>	Dinámica de aclimatación de muestras	<b>66</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pag</b>
<b>Tabla 1.</b> Escala de movilidad	<b>41</b>
<b>Tabla 2.</b> Tipo de movimiento	<b>41</b>
<b>Tabla 3.</b> Características de los individuos experimentales	<b>42</b>
<b>Tabla 4.</b> Aglutinaciones	<b>49</b>
<b>Tabla 5.</b> Variables macroscópicas del semen fresco	<b>49</b>
<b>Tabla 6.</b> Variable microscópicas del semen fresco	<b>52</b>

## RESUMEN

**TITULO:** "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO BAJO EL EFECTO DE DOS DILUYENTES EN LA GRANJA PORCICOLA VILLA ALEJANDRA"<sup>1\*</sup>

**AUTOR:** JERSON ADOLFO ESTUPIÑAN MENDEZ  
MONICA JINETH PALACIO SILVA\*\*

**PALABRAS CLAVE:** INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, DILUYENTE, CALIDAD ESPERMÁTICA

### DESCRIPCIÓN:

Con el objetivo de evaluar la influencia que tiene el manejo de la dilución y conservación en la calidad y viabilidad de semen refrigerado bajo el efecto de dos diluyentes en la Granja Porcicola Villa Alejandra, se evaluaron los eyaculados de 5 machos porcinos de las razas pietrain, pietrain\*belga e híbridos en edades de 1, 1,5 y 3 años; para esto se formularon dos tratamientos (Tx1) semen diluido en diluyente de corta conservación y (Tx2) semen diluido en diluyente de larga conservación; para la obtención de resultados y como referente de calidad inicial en el semen fresco se realizó la valoración de las características de calidad macroscópicas (color, olor, pH y volumen) y microscópicas (Motilidad, Tipo de movimiento, Aglutinaciones, Morfología, Concentración, y Test hipoosmotico (HOST)), además para las muestras de semen diluido se efectuaron valoraciones de sus características microscópicas a la hora 0, 12, 24, 36, 48, y 60, con el fin de evaluar el efecto de la refrigeración. El análisis de la información de semen diluido se realizó a través de un Análisis de covarianza con un Modelo de medidas repetidas con dos factores y uno con medidas repetidas, y para el semen fresco se efectuó un análisis descriptivo. En donde no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y se evidencio el deterioro progresivo que se presenta en las características de calidad al aumentar el tiempo de conservación, permitiendo su utilización hasta por 60 horas.

---

\* Trabajo de grado

\*\*Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. Programa de Zootecnia. Director: Ricardo Moreno Jerez Médico Veterinario Esp.; MSc (C)

## ABSTRACT

**TITLE:** "EVALUATION OF SEMEN QUALITY REFRIGERATED UNDER THE EFFECT OF TWO DILUENTS IN THE FARM PORCICOLA VILLA ALEJANDRA" \*

**AUTHOR:** JERSON ADOLFO ESTUPIÑAN MENDEZ  
MONICA JINETH PALACIO SILVA\*\*

**KEYWORDS:** ARTIFICIAL INSEMINATION, THINNER, SPERM QUALITY.

### DESCRIPTION:

In order to evaluate the influence of management dilution and conservation in the quality and viability of cooled semen under the effect of two diluents in the Farm porcicola Villa Alejandra, the ejaculates of 5 male pigs of the pietrain races were evaluated, \* Belgian and hybrid pietrain ages 1, 1.5 and 3 years; for this two treatments (Tx1) diluted semen diluent short conservation and (Tx2) diluted semen diluent long conservation were made; for obtaining results and as a reference for initial quality in fresh semen assessment of the characteristics of macroscopic quality (color, odor, pH and volume) and microscopic (Motility, type movement, agglutinates, Morphology Concentration was performed and Hypoosmotic test (HOST)), in addition to samples diluted semen evaluations of their microscopic characteristics were made when 0, 12, 24, 36, 48, and 60, in order to evaluate the effect of cooling. The analysis of the information diluted semen was performed through an analysis of covariance with repeated measures model with two factors and one repeated measures for fresh semen and a descriptive analysis was performed. Where no significant differences were found between treatments and the progressive deterioration that occurs in the quality characteristics to increase the shelf was evident, allowing its use for up to 60 hours

---

\* Trabajo de grado

\*\*Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. Programa de Zootecnia. Director: Ricardo Moreno  
Jerez Médico Veterinario Esp.; MSc (C)

## INTRODUCCION

La población mundial en la actualidad demanda de manera creciente proteína de origen animal y vegetal; La producción porcina gracias a su alto índice de conversión de alimentos, velocidad de crecimiento y facilidad de producción en confinamiento participo con un aporte del 36,6% del total del consumo de carne en 2012, FAO, 2.015.

Según los datos para 2010 de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Iberoamericana de la Porcicultura (OIPORC), los cinco primeros productores de carne de cerdo en el mundo, en su orden, son: China con un 49,4%, Unión europea 21,8%, Estados Unidos 9,9%, Brasil 3.1%, Federación de Rusia 2,2%.

La producción de carne de cerdo en Colombia es menor que la de carne bovina, el pollo, la leche y los huevos según datos publicados por la FAO,. Así mismo en los reportes de la Asociación Colombiana de Porcicultores- Fondo Nacional de la Porcicultura para 2012 y la Encuesta de Sacrificio de Ganado del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2012) se puede observar un crecimiento sostenido en el beneficio porcino así como de la carne de cerdo disponible.

La producción porcina de Colombia ha aumentado en 108% en la última década y su destino es el consumo interno. Se observó que en el periodo comprendido entre enero y mayo de 2011 se sacrificaron en el país 1.018.833 cabezas mientras que en 2012 en el mismo periodo fueron 1.136.557 cabezas, presentando un incremento del 11,55 %; para 2014 se reporta una cifra de 1.464.995 cabezas, siendo Antioquia el departamento que tiene la mayor participación con un 47,8 % de las cabezas sacrificadas; Santander por su parte presenta una participación del 1.1% con 16.520 cabezas sacrificadas. Para responder a las demandas cárnicas mencionadas, la industria porcina viene implementando técnicas biotecnológicas para lograr obtener reproductores de genética superior y por tanto elevar la productividad; una de estas técnicas es la inseminación artificial, la cual trae consigo ventajas como la propagación de genes mejoradores, reducción del número de verracos requeridos, mejora genética, control del estado sanitario disminuyendo la diseminación de enfermedades infecciosas, permite la realización de pruebas de progenie y control sobre el ritmo reproductivo de la piara entre otras. La técnica de IA requiere de un manejo óptimo para alcanzar resultados esperados, Según Flores, (2005) en la implementación y manejo de la IA se evidencian problemas al evaluar parámetros productivos como la tasa de presentación de partos y tamaño de la camada, debido al manejo y procesamiento

inadecuado del semen; estos problemas son en orden de incidencia influenciados por el proceso de inseminación en un 57%, la calidad del semen en un 33% y el manejo post-inseminación en un 10%. En la granja porcicola Villa Alejandra, situada en el municipio de Piedecuesta departamento de Santander, el uso de estas tecnologías reproductivas se encaminan al mejoramiento de índices de fertilidad y prolificidad, respondiendo con ello a las pautas de mejoramiento que impone la porcicultura actual; sin embargo el manejo del semen es deficiente ya que se ha implementado la tecnología sin evaluar los parámetros de calidad seminal, como son la concentración espermática, motilidad, morfología, integridad acrosomal, supervivencia espermática. El propósito del presente trabajo es evaluar la calidad y viabilidad de semen refrigerado bajo el efecto de dos diluyentes en la Granja Porcicola Villa Alejandra, estableciendo con esto el protocolo de manejo más conveniente del material seminal para conservar sus bondades.

## **1. PROBLEMA**

La inseminación artificial (IA), dilución y conservación del semen, se vienen implementado como una alternativa que permite optimizar los procesos de reproducción en la industria porcina. En la granja porcicola Villa Alejandra el uso de estas tecnologías reproductivas se encaminan al mejoramiento de índices de fertilidad y prolificidad; sin embargo el manejo del semen es deficiente ya que se ha implementado la tecnología sin evaluar los parámetros de calidad, como: la concentración espermática, motilidad, morfología, integridad acrosomal, supervivencia espermática y la relación con el porcentaje de repeticiones de celo que se reporta en esta granja.

### **1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

La inseminación artificial es una técnica que contribuye con el desarrollo de la industria porcina permitiendo avanzar en el mejoramiento genético, mediante el uso de reproductores de alto valor genético, reduce el número de verracos requeridos en la explotación disminuyendo directamente los costos que estos implican, así como la reducción de problemas sanitarios de carácter reproductivo al restringir el contacto de machos y hembras, aunado a esto la IA permite tener control sobre las características de calidad seminal implícita en el proceso.

Los diluyentes seminales, han contribuido de manera considerable en el uso de la IA permitiendo la utilización del material seminal colectado en un periodo de tiempo prolongado manteniendo la viabilidad espermática; pero el cuello de botella es justamente el manejo inapropiado de los procesos de dilución, conservación y manejo del material colectado. La manipulación del fluido seminal, no es una actividad que se deba tomar a la ligera, ya que de esta dependen los parámetros reproductivos y por tanto productivos de una explotación, y es justamente por esto que el manejo debe estar ceñido de manera escrupulosa a protocolos y actividades que reduzcan al máximo la degradación de las bondades y cualidades del semen a utilizar.

Con este estudio se desea evaluar la influencia de dos diluyentes en los parámetros de calidad del semen, principalmente en el efecto causado al potencial de viabilidad espermática transcurrido cierto periodo de tiempo tras la dilución y la refrigeración; estableciendo con esto el diluyente y el periodo más adecuado para la utilización de la dosis seminal, buscando de esta forma responder a la problemática de esta granja porcicola en cuanto al manejo más pertinente del semen desde el punto de vista de la influencia que este representa en la viabilidad espermática.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En explotaciones porcinas la Inseminación Artificial, según trabajos reportados por Flores, 2005 evidencia problemas en la implementación y manejo de la misma al evaluar parámetros productivos como la tasa de presentación de partos y tamaño de la camada, debido al manejo y procesamiento inadecuado del semen; estos problemas son en orden de incidencia influenciados por el proceso de inseminación en un 57%, la calidad del semen en un 33% y el manejo post-inseminación en un 10 %.<sup>2</sup>

La calidad del semen rodea aspectos implícitos en el proceso de colección, procesamiento y almacenamiento; la inseminación abarca las decisiones asociadas con el tiempo y la frecuencia de apareamientos, así como la detección de estro, procedimientos y técnicas de inseminación. El manejo de post-inseminación comprende la conducción que se da a la hembra tras la inseminación. En estos aspectos mencionados intervienen un sin número de variables que de manera directa e indirecta alteran o definen la calidad del fluido seminal que será usado en el proceso de IA.

En la granja porcicola Villa Alejandra es evidente que el punto crítico dentro del proceso de IA está representado por el manejo inadecuado y la deficiente calidad de las dosis seminales; aspecto apremiante puesto que está directamente comprometido con indicadores y parámetros productivos los cuales ratifican con regularidad esta afectación en la presentación de porcentajes de repeticiones que circundan el 20%.

La inadecuada administración del potencial reproductivo de esta granja ha llevado a que el material colectado sea insuficiente para el total de hembras a inseminar por banda, siendo esta de 30 cerdas, con respecto a los 6 machos que se tienen en uso, lo anterior causado por la irregularidad de colección que se realiza a los verracos.

Considerando lo anterior y desde un punto de vista zootécnico, el desarrollo de esta investigación busca desarrollar una evaluación in vitro del material seminal colectado, calculando y evaluando variables y características controlables dentro del contexto estadístico y que de manera cuantitativa y cualitativa permiten realizar una predicción de fertilidad o viabilidad con base en la calidad espermática

---

<sup>2</sup> FLOWERS, W. Semen quality assurance [en línea]. En: Anual North Carolina pork conference, (49: 16-17, febrero: Greenville, Carolina del Sur). Semen quality assurance. Raleigh, Department of Animal Science North Carolina State University. 2005, [consultado el 13 de marzo de 2015]. Disponible en: ([http://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/ncporkconf/2005/sessions/flowers.htm](http://www.ncsu.edu/project/swine_extension/ncporkconf/2005/sessions/flowers.htm)).

observada. Además el proceso que se desarrollaría serviría de patrón de referencia en la granja para establecer el procedimiento de manejo, dilución y establecer así el tiempo efectivo de utilización de la dosis seminal en pro del mantenimiento del potencial espermático y por tanto de un aprovechamiento real de la capacidad reproductiva de los verracos así como también de mejoras en la planeación de los eventos reproductivos con repercusión positiva en los indicadores productivos de la granja.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la influencia que tiene el manejo de la dilución y conservación en la calidad y viabilidad de semen refrigerado bajo el efecto de dos diluyentes en la Granja Porcicola Villa Alejandra.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar de manera comparativa las variables asociadas a la calidad seminal de los reproductores de la granja porcicola Villa Alejandra en el semen fresco.
2. Evaluar el efecto de la refrigeración del semen porcino con respecto a la eficiencia de los diluyentes sobre las variables asociadas a la calidad y viabilidad seminal.
3. Estandarizar el manejo de conservación del material genético para mejorar la eficiencia reproductiva de la piara.

## 4. MARCO REFERENCIAL

### 4.1 MARCO TEORICO

**4.1.1 Inseminación Artificial en porcinos** El origen científico de la inseminación artificial en las especies domesticas parte de las experiencias llevadas a cabo en 1779 por Lázaro SPALLANZANI en la perra. En la especie porcina comenzaron en el siglo pasado, al principio de la década de los años 30, en Rusia, con MILOVANOV. Su desarrollo y aplicación a gran escala en la producción porcina ha sido especialmente lenta. Solamente en los últimos 20 años hemos sido testigos de su difusión a gran escala tanto en Europa, como en USA y Canadá, donde se estima que la gran mayoría de las hembras reproductoras porcinas quedan preñadas mediante inseminación artificial (IA); esto coincide con lo descrito por González , (2004). Quien reporta en los grandes países productores de cerdo el porcentaje de sustitución de la monta natural por la técnica de inseminación artificial así: España con 82%, Noruega 70%, Alemania y Francia 50%, Pero en nuestro país no es muy utilizado este método, y en países cómo en Argentina solo llega al 4%<sup>3</sup>.

**4.1.2 Desarrollo de la inseminación artificial en porcinos** La base biológica de la IA se fundamenta en la sobreabundancia de espermatozoides en el eyaculado; es decir en un solo eyaculado existen un número de espermatozoides que permiten extrapolar la fecundación a un número elevado de hembras, en la especie porcina con técnicas tradicionales de gametización instrumental, y con semen fresco refrigerado entre 15 y 17°C, está comprendido entre 15 y 40 hembras.<sup>4</sup>

El desarrollo de la “vagina artificial” iniciado por G. AMANTEA en 1914, en la universidad de roma, influyo notablemente en la difusión de la técnica en numerosas especies, con especial fortuna en bóvidos. Sin embargo; en la especie porcina no tuvo tanta repercusión, y de hecho todavía en la actualidad la vagina artificial no es el método más popular de recogida seminal en el verraco, siendo más profusamente utilizado el método de “*mano enguantada*”. Mucho más que la vagina artificial, influyo en el desarrollo de la IA porcina el diseño del “*maniquí*” de

---

<sup>3</sup> BONET, S., MARTINEZ, E., RODRIGUEZ, J. E., BARRERA, X. Biotecnología de la reproducción porcina: Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Girona.: Universidad de Girona, 2006. P. 13.

<sup>4</sup> Ibíd., p.11-12

recogida, que de forma burda semeja el perfil de una hembra en celo, y que permite excitar la libido del verraco sin estar la hembra presente.<sup>5</sup>

Otro hecho importante dentro de la IA porcina fue el diseño de los medios de dilución que prolongasen la viabilidad seminal, tanto en fresco como refrigerado a 15 a 17°C, al menos durante 3 o 4 días, lo que permite su uso sin gran pérdida en la fertilidad y prolificidad.<sup>6</sup>

“La inseminación artificial constituye una alternativa económica y práctica para incorporar el mejoramiento genético dentro de las explotaciones porcinas (Olivares M, 2012)”<sup>7</sup>; “En el desarrollo de la producción porcina actual la inseminación artificial resulta imprescindible, ya que la misma, entre sus ventajas más importantes, permite aumentar la presión de selección, pues el número de cerdas que pueden ser cubiertas por el mismo macho es de 8 a 10 veces superior a la monta natural”.<sup>8</sup>

**4.1.3 Diluyentes espermáticos** “Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad”.

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del genital y del útero femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un periodo de tiempo muy limitado, como es conocido desde los primeros estudios sobre la conservación del semen porcino (Lewis, 1911). Para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura.

Las peculiares particularidades que presenta el espermatozoide porcino hacen que sea muy sensible al Shock por frío (Pursel et al., 1973), que produce una alteración de la viabilidad espermática. En concreto la composición lipídica de sus membranas parece ser la responsable de esta situación. Así, cuando se reduce la temperatura, los movimientos laterales de los fosfolípidos que componen la

---

<sup>5</sup> *Ibíd.*, pág. 9

<sup>6</sup> *Ibíd.*, Pág. 10

<sup>7</sup> OLIVARES MUÑOZ, A. Parámetros reproductivos en cerdas inseminadas con semen refrigerado en presencia de plasma seminal homólogo. Trabajo de grado Médico Veterinario Zootecnista. Veracruz.: Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2012. p.10.

<sup>8</sup> ARIAS, T., CABALLERO, N., DIEGUEZ, F. J. Características del semen y calidad espermática de verracos. *En*: Revista Computarizada de Producción Porcina Instituto de Investigaciones Porcinas. 2001. Vol. 8, no. 1, p. 2.

membrana se ven reducidos y se producen separaciones de fases lipídicas, situación asociada a alteraciones irreversibles de las proteínas de las membranas. Todo hace que se altere la funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se vea comprometida (revisado por White, 1992). Esta susceptibilidad al choque por frío, supone en la práctica que las muestras seminales deban ser conservadas a 15 – 20°C, ya que una reducción en la temperatura de almacenamiento limita la viabilidad de las muestras seminales (Paulenz et al., 2000).

La conservación a temperaturas moderadamente reducidas limita la capacidad de almacenamiento de las muestra; por una parte debido a que no puede reducirse el metabolismo celular y por otra parte no pueden ser controladas las condiciones microbiológicas con la misma efectividad de temperaturas inferiores a (5°C).

Por otro lado, el efecto de dilución lleva a que determinados compuestos presentes en el plasma celular estén en muy bajas concentraciones en el semen diluido y alteren la viabilidad espermática, como por ejemplo la reducción de la concentración de  $K^+$  (Harrison et., 1978), o de proteínas plasmáticas. Estas pérdidas deben compensarse con la adecuada formulación del diluyente; así por ejemplo la adición de albumina sérica bovina (BSA), ya que se ha demostrado que esta adición estimula la motilidad (Waberski et al.1989) y mejora las tasas de fertilidad del semen conservado (Waberski et al. 1994).<sup>9</sup>

**4.1.3.1 Función de los diluyentes** El diluyente tiene como función aumentar el volumen del eyaculado y preservar la viabilidad de los espermatozoides. Básicamente los diluyentes proveen una fuente adecuada de nutrientes, un ambiente que proteja a los espermatozoides contra la disminución de temperatura, electrolitos para mantener una adecuada presión osmótica, sustancias buffer que protejan al semen cambios externos de pH y antibióticos que inhiban el crecimiento de bacterias. El plasma seminal por sí solo no permite que haya una conservación duradera del semen<sup>10</sup>.

**Nutrientes:** El espermatozoide tiene la capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en la mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más frecuentemente utilizada en la composición de los diluyentes es la glucosa.<sup>11</sup>

---

<sup>9</sup> GADEA, J. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. En: Spanish Journal of Agricultural Research. 2003. Vol. 1, no. 2, p. 3.

<sup>10</sup> HERRERA GALINDO, Volvamos al campo: Inseminación en porcinos. Bogota.Colombia.: Grupo Latino, 2003. P. 23.

<sup>11</sup> GADEA, J, 2003. Óp. Cit. Pág. 20

**Regulación del pH:** El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a  $7.4 \pm 0.2$ , al igual que otros fluidos orgánicos, y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del espermatozoide y su motilidad. El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como índice de calidad seminal (Rigau et al., 1996).

La adición de agentes tampón ayudan, por tanto, a controlar el pH del medio. Entre los tamponadores más simples se encuentran el bicarbonato y el citrato (sódico) que presentan una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros más complejos (TES, HEPES, MOPS, TRIS) pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (MOPS Y HEPES).

El pH de los diluyentes normalmente utilizados oscila entre 6.8 y 7.2, pero hemos de tener en consideración que el pH de estos medios no se estabiliza hasta pasado unos 60 – 90 minutos del inicio de la dilución en agua y que los distintos diluyentes presentan un diferente patrón de cambio de su pH a lo largo del tiempo (Newth y Levis, 1999). Por lo que se han de tomar las medidas oportunas en el proceso de preparación de los diluyentes antes de su uso, para evitar problemas en el proceso de conservación.<sup>12</sup>

**Presión osmótica:** El espermatozoide porcino presenta una presión osmótica de 290 – 300 mOsm, y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio (240 – 380 mOsm). Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm (Fraser et al., 2001), mientras que cuando se reduce por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad (Gilmore et al., 1996, Fraser et al., 2001). En cualquier caso, los diluyentes isotónicos (300 mOsm) o ligeramente hipertónicos son los que mejores resultados han dado en condiciones de utilización comercial. Para regular la presión osmótica se utiliza principalmente sales de iones inorgánicos como el cloruro sódico y potásico<sup>13</sup>.

**4.1.3.2 Clases de diluyentes** Los diluyentes se clasifican en dos grandes grupos según en tiempo de conservación:

---

<sup>12</sup> Ibíd. Pág. 20

<sup>13</sup> Ibíd. Pág. 20

“Conservación a Corto Plazo: Conservan la calidad del semen durante 1 – 3 días, y son usados principalmente en la misma granja o en distancias cortas”.<sup>14</sup>

“Conservación media duración a Largo Plazo: Los de media duración conservan el semen por (4 días); los de larga duración son más complejos en su composición conservan hasta por (6 días), son usados principalmente en los sitios en donde la distancia entre el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado es grande”.<sup>15</sup>

**4.1.3.3 Diluyentes y sus características de composición** Según lo descrito por Gadea 2003, en su revisión en cuanto a los tipos de diluyente y su composición reporta que los primeros diluyentes rusos correspondían a soluciones de glucosa con tartrato de sodio o potasio o sulfato sódico y peptonas, manteniendo en cualquier caso bajos niveles de electrolitos (revisado por Foote, 2002). Posteriormente en la década del 50, se produjo el desarrollo de los diluyentes para el ganado bovino, basados en yema de huevo con fosfato o citrato y leche, y se hicieron algunas adaptaciones para conservar semen porcino (revisado por Foote, 2002). Entre otros, cabe destacar la adaptación del diluyente Illinois Variable Temperature que IVT se utilizaba para la conservación de semen en el ganado vacuno a temperatura ambiente (du Mesnil du Buisson y Dausier, 1959). Este IVT medio está basado en una solución de glucosa, citrato, bicarbonato y yema de huevo, pero necesitaba ser gaseado con CO<sub>2</sub> para reducir la actividad metabólica.

En la década de los 60, se produce una gran innovación consistente en la adición de un agente quelante (EDTA), que permitiría bloquear la acción del calcio como mediador de los procesos de capacitación y reacción acrosómica. Es cuando aparece el diluyente Klev (Plisko, 1965) que posteriormente ha sido modificado y recibido otras denominaciones (EDTA, Merk I, Plisko, Guelph). Este medio Klev permitió una amplia difusión de la IA porcina y todavía sigue utilizándose con éxito en nuestros días.

En la década de los 70, destaca la ingente labor que se realiza en el centro Beltsville (USA) acerca del estudio de las posibilidades de conservación de los espermatozoides porcinos. Bajo la dirección de Pursel y Johnson se realizan un gran número de ensayos para poner a punto diluyentes para refrigeración (BL-1, Pursel et al., 1973 b) y congelación (BF-5, Pursel y Johnson, 1975), pero sin duda la mayor difusión la alcanzan con el medio BTS (Beltsville Thwing Solution, Pursel y Johnson, 1975) diseñado en un principio como medio de descongelación y que fue adaptado al semen refrigerado (Johnson et al., 1988). Posiblemente el BTS es el más usado en la actualidad en todo el mundo. Este medio se

---

<sup>14</sup> Ibíd. Pág. 22

<sup>15</sup> Ibíd. Pág. 22

caracteriza por añadir una pequeña cantidad de potasio, que permite mantener la actividad de la bomba sodio potasio y evita la reducción intracelular que estaría asociada con la disminución de la motilidad (Álvarez y Storey, 1982)

El primero de los diluyentes de los denominados de larga duración fue el Zorlesco (Gottardi et al., 1980), que se caracteriza por ser un medio bastante más complejo, con la adición de TRIS como regulador de pH, albumina sérica bovina (BSA) y cisteína en su composición. Esta cisteína (como otros compuestos con grupos sulfhidrilo) permitiría estabilizar las membranas e inhibir el proceso de capacitación (Johnson et al., 2000). La utilización de este diluyente en condiciones de campo no produjo unos resultados satisfactorios, en parte debido a desequilibrios en su composición que suponen una presión osmótica final reducida (240 mOsm), posteriormente Moretti (1981) crea el diluyente Modena, incrementando la proporción de glucosa y eliminando la BSA del medio Zorlesco, pero los resultados de fertilidad obtenidos tampoco son satisfactorios (Johnson et al., Laforest y Allard, 1996).

Por otra parte, en España Santiago Rillo y Eulogio Alias desarrollan el medio MR-A (Martin Rillo, 1984) y aunque no se ha hecho pública su composición cuantitativa (protegida por razones comerciales) sí la cualitativa. Este medio ha dado muy buenos resultados como diluyente de larga duración.

En esta misma época se diseñaron dos diluyentes de larga duración en el Reino Unido, SORPVA (Chenh, 1985) y Reading (Revell y Gossop, 1989). Estos son medios complejos basados en el medio Zorlesco ligeramente modificado y al que se le añade alcohol de polivinilo como macromolécula (PVA) con lo que mejora el porcentaje de acrosomas intactos. Estos diluyentes superan un coste superior (149 – 163%, Reed y Curnock, 1990) a los diluyentes de corta duración y con unos resultados no superiores a los obtenidos con otros diluyentes (Reed y Curnock, 1990), por lo que realmente no se ha extendido su uso.

En 1990 Wietze presenta el diluyente Androhep, que se caracteriza por contener HEPES como regulador del Ph, la adición de BSA, para compensar el efecto dilución de las proteínas de plasma seminal y por presentar una presión ligeramente hipertónica (309 mOsm). Este diluyente ha tenido una importante aceptación en el sector como diluyente de larga conservación.

En los últimos años han aparecido nuevos diluyentes (Acromax, X-Cell, Androhep plus, Vital, SpermAid, Mulberry III, etc) que se encuadran dentro del grupo de larga duración. Lamentablemente, la composición cuantitativa de estos medios no es conocida, ya que esta protegida por razones comerciales y, aunque no dudamos de las bondades de estos diluyentes, hasta el momento se dispone de escasa información de los resultados de fertilidad en estudios comparativos realizados por centros independientes, por tanto debemos esperar hasta que esta información se haga pública.

En cuanto a los diluyentes empleados en los procesos de congelación de semen porcino hemos de decir que están basados en la utilización de yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente (Orvus et paste). De los diluyentes utilizados destacamos el medio lactosa-yema de huevo que es el más frecuente empleado y el descrito por Pursel y Johnson (1975) denominado BF-5, cuya composición se incluye glucosa, yema de huevo y Tris como ente regulador de pH, que utiliza en los procesos de congelación en píldoras (pellets) sobre nieve carbonica.<sup>16</sup>

**4.1.4 Características del semen porcino** El eyaculado del verraco destaca por su volumen elevado y por contener una sustancia gelatinosa conocida con el nombre de tapioca. La eyaculación se divide en tres fases durante las cuales se emiten tres fracciones seminales:

Fracción pre espermática: constituida por un líquido transparente y pobre en espermatozoides. Supone el 20% del total del eyaculado.

Fracción espermática: de color blanco a cremoso, rica en espermatozoides. Constituye de un 30 a un 40% del volumen total del eyaculado.

Fracción post espermática: compuesta principalmente por tapioca y líquido seminal con baja concentración de espermatozoides. Representa de un 40 a un 60 % del eyaculado.<sup>17</sup>

#### **4.1.5 Factores de fecundidad relacionadas con el macho**

**4.1.5.1 Genética** En algunas razas, la madurez sexual se alcanza a edades más tempranas que en otras (Bazer et al., 1988). No solo varía el ardor genético entre razas, más marcado en animales híbridos (Irgang et al., 1994), también el volumen y la concentración del semen son distintos en función de su genética (Martin, 1982). Por tanto, el tipo de genética del verraco afectará a los resultados de la inseminación, es decir a la fertilidad y a la fecundidad.

Entre las diversas razas, los machos Large White, Landrace y Duroc tienen mayor producción de espermatozoides que los Landrace Belga, Pietrain y Hampshire (Martin, 1982), Gisalvez et al. (1999).<sup>18</sup>

---

<sup>16</sup> GADEA, J. 2003. Óp. Cit. Pág. 19

<sup>17</sup> DAZA, Argimiro. Manejo de la reproducción en el ganado porcino. Madrid.: Aedos, 1992. P. 265

<sup>18</sup> BABOT, D. Gestión en empresas de producción porcina análisis, diagnóstico y toma de decisiones [en línea]. [Lleida, España]: Universidad de Lleida, 2001 [consultado el 04 de febrero de 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=6DH0TOLD94C&pg=PA75&pg=PA75&dq=Cameron,+R.D.:Sexual+development+and+semen&source=bl&ots=IGttunQAJT&sig=\\_cGP\\_2VR\\_nsdIqwCERegzOxQwo&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiPwdu4z9\\_KAhWH9x4KHwkbA3QQ6AEIjAA#v=onepage&q=Cameron%2C%20R.D.A.%3ASexual%20development%20and%20semen&f=false](https://books.google.com.co/books?id=6DH0TOLD94C&pg=PA75&pg=PA75&dq=Cameron,+R.D.:Sexual+development+and+semen&source=bl&ots=IGttunQAJT&sig=_cGP_2VR_nsdIqwCERegzOxQwo&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiPwdu4z9_KAhWH9x4KHwkbA3QQ6AEIjAA#v=onepage&q=Cameron%2C%20R.D.A.%3ASexual%20development%20and%20semen&f=false)

**4.1.5.2 Edad (biológica sexual)** La edad del animal está muy relacionada con la producción y las características del semen (Hemsworth et al., 1983), variando tanto la calidad como la cantidad.

Los machos deben entrenarse y acostumbrarse al potro y posteriormente, a los 8 meses de edad, se ponen en servicio. El volumen de eyaculado, la concentración y por tanto el número de dosis de inseminación, de los machos de menos de 9 meses de edad es inferior al de los machos adultos (Kennedy y Wilkins, 1984), aumentando de forma marcada entre los 7 y los 12 meses de edad, alcanzando los niveles máximos alrededor de los 3 años (Cameron, 1987). Según Greenberg y Mahone (1981), la calidad espermática y el porcentaje de espermatozoides normales, aumenta durante la pubertad. Sin embargo, en otro estudio se afirma que el porcentaje de formas anormales se incrementa, gradualmente, desde la pubertad y a medida que aumenta la edad (Bach et al., 1982).<sup>19</sup>

**4.1.5.3 Peso vivo** Es una norma general que los verracos deben estar sometidos a un control de peso para prevenir problemas de patas o de lívido. Sin embargo, y a pesar de que a menudo se ha dicho que no afecta a la producción de semen, trabajos realizados por Colenbrander y Kemp, (1990), han demostrado el impacto negativo de los bajos niveles de alimentación sobre la producción espermática del verraco; además Louis et al., (1994) observaron un descenso de la lívido con dietas bajas en energía y proteína. Cameron, (1987), encontró una gran correlación positiva entre la cantidad total de espermatozoides en el eyaculado y el peso corporal, comparado con la edad. Owsianny, (1996), por su parte, encontró que el tamaño de los testículos estaba correlacionado positivamente con el peso vivo del macho y con la calidad del semen.<sup>20</sup>

**4.1.5.4 Estado sanitario** Diversos agentes etiológicos, (*Corynebacterium*, *Streptococcus*,...), pueden ocasionar enfermedades que afectan al aparato reproductor del verraco, modificando la lívido y la calidad espermática (Colenbrander y Kemp, 1990). En caso de utilizar la monta natural, muchas enfermedades pueden transmitirse a las hembras vía macho. Por ello, la mejor manera de evitar el contagio de enfermedades mediante el semen, es que el verraco pase una cuarentena antes de entrar en la explotación, que sea sometido a un control serológico y que, una vez dentro, encuentre una condición higiénica sanitaria adecuada, en las que se incluyen planes de vacunación, antiparasitarios, desinfectantes, etc.<sup>21</sup>

---

<sup>19</sup> Ibid., Pág, 68

<sup>20</sup> Ibid., Pág, 68

<sup>21</sup> Ibid., Pág, 69

**4.1.5.5 Condiciones ambientales** Como condiciones ambientales tomaremos la temperatura y la humedad que soportan los animales. Principalmente es la temperatura la que influye sobre el comportamiento reproductivo del verraco (Sánchez et al., 1990). Así, según Colenbrander y Kemp, (1990), las altas temperaturas reducen la movilidad y la producción espermática, mientras que las bajas temperaturas no tienen influencia. En trabajos realizados por Gosalvez et al. (1999), también se afirma que la temperatura es el principal factor ambiental que afecta el eyaculado, mientras que la humedad relativa solo incide sobre el volumen. Por tanto será recomendable acondicionar correctamente la explotación para evitar que los animales sufran un exceso de temperatura y que pueda así, alcanzar la máxima productividad.<sup>22</sup>

**4.1.5.6 Manejo** Un exceso de extracciones del macho disminuyen su fertilidad, ya que el factor que más incide en la calidad y morfología espermáticas es la frecuencia con la que se recoge el semen, en el sentido de que un aumento o disminución excesivos de dicha frecuencia comportan un deterioro considerable de la calidad y morfología espermáticas del semen obtenido (Swiestra, 1973). Muchos estudios demuestran que el volumen y el número de espermatozoides disminuyen con un aumento de la frecuencia de eyaculación (Cameron, 1987; Strezezek et al., 1995). Es importante que entre eyaculaciones exista un intervalo de tiempo que permita al epidídimo recuperar su nivel de reserva de espermatozoides por eyaculado (Schilling et al., 1987). Se recomienda un intervalo mínimo de 7 días para cerdos de entre 10-12 meses de edad, mínimo de 7 días y máximo de 14 para machos de entre 10-12 meses de edad y para machos con más de 12 meses de edad, el intervalo entre extracciones debería ser, mínimo 4 días y máximo 14 (Castro, 90).

Es fundamental el uso regular de los verracos, de tal manera que los jóvenes con 7 meses de edad deben realizar 1-2 servicios por semana durante los tres primeros meses. En este sentido Williams et al., (1991), concluyeron que los mejores valores en cuanto a calidad y cantidad de semen en verracos de entre 14 y 24 meses de edad, se obtienen con una frecuencia de recogida de 2 a 3 veces por semana.

Uno de los aspectos más importantes del manejo de los machos en la reproducción, a parte de la producción seminal, es la manera en que se debe utilizar para provocar el estímulo de la cerda y más concretamente para provocar el estímulo de la pubertad en cerdas primerizas. De entre las diferentes técnicas utilizadas para este fin, las más empleadas han sido la terapia hormonal, el provocar situaciones de estrés y el contacto con el verraco. Aunque

---

<sup>22</sup> *Ibíd.*, Pág, 69

aparentemente todos están en vigencia, el más adecuado es el uso controlado de la exposición al verraco. Se ha demostrado que la exposición de primerizas pre púberes al verraco puede adelantar la aparición del primer celo. Aunque la estimulación de la pubertad de las hembras está muy influenciada por la edad del macho, siendo necesario que el macho tenga entre 9 – 10 meses de edad, (Kirwood y Hughes, 1981).<sup>23</sup>

**4.1.6 Evaluación seminal.** En los centros de inseminación artificial porcina se evalúa la capacidad fecundante de un reproductor mediante un conjunto de pruebas de análisis de semen que comprenden controles macroscópico, microscópico, bioquímico y microbiológico. A nivel de explotación solo se realiza el control macroscópico y microscópico.

El control macroscópico tiene en cuenta el volumen del eyaculado, el olor, color y viscosidad del semen y el control microscópico agrupa pruebas de motilidad, de determinación de concentración de espermatozoides y de morfo anomalías.<sup>24</sup>

“Las ya mencionadas pruebas de análisis están relacionadas con la fertilidad del animal, pero presentan variaciones de fertilidad individual que en ocasiones, sobreestiman o subestiman el potencial fecundante del macho”.<sup>25</sup> Las pruebas de resistencia osmótica o test hipoosmotico evalúan la integridad de la membrana espermática y acrosomal, a través de técnicas de tinción, y de exposición a medios hipotónicos. Según lo reportado por CABRERA, P y PANTOJA, C, esta valoración permite predecir con bastante confiabilidad la capacidad fértil en el macho, toda vez que se ha encontrado correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad in vivo.

## 4.2 MARCO HISTORICO

**4.2.1 Evaluación de calidad seminal** De acuerdo con lo reportado por (Gadea, 2004) Los métodos clásicos de evaluación de semen miden la concentración espermática, motilidad progresiva, porcentaje de células viables, y la morfología del acrosoma; pero son pobres en la predicción de la fertilidad del semen.

La evaluación de la motilidad ha sido ampliamente usada como indicador de predicción de la integridad de las membranas y su funcionalidad debido a que consiste en un método simple, rápido y de bajo costo a pesar de considerarse

---

<sup>23</sup> Ibid., Pág, 68

<sup>24</sup> DAZA, Argimiro.1992, Óp., cit.

<sup>25</sup> CABRERA, P. PANTOJA, C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. En: Rev Inv Vet. 2012. Vol. 23, no.2 p.194.

como una medida subjetiva ya que su apreciación depende del observador individual; con respecto a su valoración se reportan relaciones significativas con la tasa de partos y el número total de lechones nacidos; aunque manifiesta índices de correlación bajos con respecto de la fertilidad posiblemente a causa de diferencias experimentales.<sup>26</sup>

La Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es requisito para un metabolismo adecuado del esperma y su estudio de acuerdo con lo descrito por (Gadea 2001), parece ser un buen procedimiento para evaluar la funcionalidad del gameto masculino.<sup>27</sup>

(SANCHEZ y col) señalan que la membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito. Y de acuerdo con lo ya descrito por (Gadea, 2001) La evaluación de su integridad constituye una importante información en la evaluación de la fertilidad potencial del macho. Además, la integridad no sólo es fundamental para el metabolismo del espermatozoide, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción del acrosoma y, por lo tanto, para la fertilidad del macho.<sup>28</sup>

Los diferentes métodos para la evaluación de la membrana incluyen la tinción de eosina-nigrosina y varias manchas fluorescentes (yoduro de propidio, diacetato de carboxifluoresceína, SYBR-14, Hoechst 33258, etc.). Sin embargo, esta información sobre la estructura de la membrana no está estrechamente relacionado con la fertilidad, tal vez debido a que proporciona información acerca de la viabilidad de los espermatozoides, pero no sobre la su funcionalidad (proceso de capacitación, reacción del acrosoma, la unión del esperma, etc.).<sup>29</sup>

Los nuevos ensayos de esperma tratan de explorar la capacidad funcional de los espermatozoides. Estas pruebas constituyen análisis de los procesos celulares exhibidos por los espermatozoides entre el momento en que abandonan el líquido seminal y el paso final de la fecundación. Con estos se busca determinar la capacidad de los espermatozoides para capacitar y fertilizar. Entre estas pruebas funcionales, el estudio de la membrana plasmática del espermatozoide o membranas es de particular importancia ya que se requiere de membranas

---

<sup>26</sup> GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. En: Theriogenology. Junio, 2005. Vol. 15, no .63, p. 439.

<sup>27</sup> ACOSTA, J. Técnicas de contraste en la evaluación del semen porcino. En: Revista Computarizada de Producción Porcina. 2005. Vol. 12, no. 3, p.171.

<sup>28</sup> SANCHEZ, A., RUBILAR, J., GATICA, R. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. En: Arch. med. vet. 2002. vol. 34, no.1, p. 132.

<sup>29</sup> GADEA, J. 2004. Op cit. p.440

bioquímicamente activas en el proceso de capacitación, la reacción del acrosoma y la unión del espermatozoide a la superficie de los ovocitos.<sup>30</sup>

Las pruebas de funcionalidad espermáticas se pueden dividir en dos apartados diferentes; pruebas de respuesta osmótica y pruebas de función metabólica

**4.2.2 Pruebas de respuesta osmótica** Los espermatozoides, presentan diversos mecanismos de adaptación y resistencia a cambios bruscos en la osmolaridad del medio. Estos mecanismos involucran vías metabólicas complejas, por tanto la capacidad de respuesta ante un stress osmótico por parte del espermatozoide se encuentra relacionada directamente con la capacidad funcional general de esta célula. Bajo esta premisa, en los últimos 15 años se han desarrollado un conjunto de pruebas de calidad seminal basadas en la respuesta de los espermatozoides frente a un “shock” osmótico, estas pruebas se pueden agrupar en tres tipos: las pruebas de hinchamiento hipoosmotico (HOS test), Las pruebas de resistencia osmótica (ORT) y las pruebas de resistencia hipoosmotico (HRT).<sup>31</sup>

**4.2.2.1 Pruebas de hinchamiento osmótico** Una de las respuestas más conocidas que tienen las células eucariotas cuando se encuentran en un medio hiposmotico (por debajo de los 300 mOsm) es la de hincharse para tratar de equilibrar su contenido iónico con el del medio externo. En concreto los espermatozoides sometidos a un stress hiposmotico manifiestan un enrollamiento de sus colas. Basándose en esta respuesta Zaneveld diseño para espermatozoides humanos un test de respuesta osmótica, el “el hiposmotic Swelling Test” (HOST), el cual mostro una buena correlación con la capacidad fertilizante del eyaculado.<sup>32</sup>

Hasta ahora, sin embargo, su uso en evaluaciones seminales de verracos ha sido limitado. El HOS es un ensayo simple, fácil de realizar, barata y repetible. Que reporta relación positiva con índices de fertilidad in vitro. Pruebas realizadas en caninos reportan Correlaciones obtenidas entre la respuesta al HOS y algunos parámetros convencionales de evaluación seminal: HOS v/s Motilidad Progresiva  $r = 0.65$  ( $p < 0.01$ ); HOS v/s espermatozoides vivos  $r = 0.61$  ( $p < 0.01$ ) y HOST v/s espermatozoides normales  $r = 0.85$  ( $p < 0.01$ ). Señalando así que la prueba hipo osmótica estima de manera eficiente la fertilidad potencial del semen canino.<sup>33</sup>

---

<sup>30</sup> *Ibíd.*, Pág 434

<sup>31</sup> BONET, S., MARTINEZ, E., RODRIGUEZ, J. E., BARRERA, X. 2006. *Op.*, cit p. 69

<sup>32</sup> *Ibíd.*, Pág 69

<sup>33</sup> SANCHEZ, A., RUBILAR, J., GATICA, R. 2002 *Op.*, cit p. 108

**4.2.2.2 Test de resistencia osmótica (ORT)** Se basa en la capacidad que tienen las membranas espermáticas de resistir un shock hiposmótico. Para ello se evalúa el estado de las membranas acrosomales en espermatozoides sometidos a dicho shock. El espermatozoide del cerdo es una célula de gran tamaño lo cual permite una fácil valoración de su integridad acrosomal bajo observación microscópica. Teniendo en cuenta que el ORT determina la proporción de acrosomas alterados en espermatozoides incubados en un medio isosmótico respecto a otros incubados en un medio equivalente hiposmótico. Una vez evaluado el porcentaje de acrosomas intactos, el valor del test se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{ORT (\%)} = 100 - \frac{(\text{AIM} + \text{AHM})}{2}$$

En donde:

AIM: porcentaje de alteraciones acrosomales en el medio isosmótico

AHM: porcentaje de alteraciones acrosomales en el medio hiposmótico

Entre mayor sea el valor de la fórmula, peor será la calidad seminal.<sup>34</sup>

**4.2.2.3 HRT Test** Esta prueba se basa en resultados obtenidos que indicaron que la capacidad de resistencia a cambios súbitos de osmolaridad de los espermatozoides porcinos está relacionada con la calidad seminal porcina, tanto cuando se compara con otras pruebas “in vivo” como cuando se utiliza como indicador de calidad seminal “in vivo”.

El porcentaje de respuesta al HTR se calcula mediante la fórmula:

$$\text{VHUPER} = \text{VD} / \text{VU}$$

Donde VHUPER es el resultante de viabilidades del test HRT, VD es el porcentaje de espermatozoides observados en el medio isosmótico y VU es el porcentaje de espermatozoides viables observados en el medio hiperosmótico.<sup>35</sup>

## 4.3 MARCO LEGAL

Algunas de las normas más recientes de importancia para el sector porcícola son:

**4.3.1 Del Control y vigilancia del material con destino a la reproducción animal** En la resolución 2028 del 11 de octubre del 2001 el Ica “ejerce el control técnico-científico del material con destino a la reproducción animal para prevenir riesgos en la salud animal y mejorar la producción y productividad pecuaria del

---

<sup>34</sup> BONET, S., MARTINEZ, E., RODRIGUEZ, J. E., BARRERA, X. 2006. Op., cit p. 72

<sup>35</sup> *Ibíd.*, Pág 72

país, a través de la vigilancia sobre: los centros de recolección de semen y embriones de bovinos, pequeños rumiantes, porcinos y equinos, las granjas aviares de reproductoras e incubadoras”.

**4.3.2 Del Recaudo de la cuota de fomento** De conformidad a lo establecido en la ley 272 de marzo 14 de 1996, el Decreto reglamentario 1522 del mismo año, la Ley 623 de noviembre 21 de 2000 y la Ley 1500 de diciembre 29 de 2011. Se establece El Fondo Nacional de la Porcicultura el cual es una cuenta nacional utilizada para el recaudo de la Cuota de Fomento Porcicola, la cual corresponde al 32% de un salario mínimo diario legal vigente.

**4.3.3 Del control de la cadena cárnica porcicola** En la resolución 0126 de 2011 el ministerio de agricultura y desarrollo rural “reconoce la organización de cadena cárnica porcina”.

Decreto Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 1828 de junio 9 de 2006. “Por el cual se crea la Comisión Nacional Intersectorial para la Coordinación y Orientación Superior del sacrificio de porcinos, con el objetivo de apoyar las actividades necesarias para el cumplimiento de la normatividad sobre inspección, vigilancia y control del sacrificio de porcinos en el territorio nacional.

Decreto Ministerio de Protección Social 1500 de mayo de 2007. “Por el cual se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos, destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación.

Resolución Ministerio de Protección 4282 de noviembre de 2007. “Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de la especie porcina destinada para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desposte, almacenamiento, comercialización, expendio, transporte, importación o exportación.

Resolución ICA 2640 de septiembre de 2007. “Por la cual se reglamentan las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado porcino destinado al sacrificio para consumo humano”.

Resolución Invima 2008000715 de enero de 2008. “Por la cual se reglamenta el Plan Gradual de Cumplimiento para plantas de beneficio y salas de desposte de

porcinos y se establecen los procedimientos para los procesos de inscripción, autorización sanitaria y registro de estos establecimientos”.

**4.3.4 De la erradicación de la peste porcina clásica** El decreto **930 de 2002** del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el cual se reglamenta la **ley 623 de 2000** por el cual se establece la peste porcina como enfermedad de interés social, así como el programa para su Erradicación.

#### **4.4 MARCO CONCEPTUAL**

**PORCICULTURA:** La Porcicultura abarca todas las actividades dirigidas a la producción y comercialización de cerdos. La FAO señala que la actividad del cultivo implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción en operaciones, la alimentación y protección de depredadores entre otros.

**BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA:** Comprende una serie de biotécnicas que están permitiendo aumentar la productividad y la tasa de mejoramiento genético de los animales ampliando la eficiencia reproductiva y una calidad superior de sus productos

**INSEMINACION ARTIFICIAL:** Técnica de reproducción asistida en la que se introduce el espermatozoide en la vagina de la hembra por medios mecánicos

**DILUYENTE:** Sustancia que aumenta el volumen y mantiene óptima la vitalidad y capacidad fecundante de los espermatozoides.

**ESPERMATOZOIDE:** Célula haploide que constituye el gameto masculino. Su función es la formación de un cigoto al fusionarse su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar, posteriormente, al embrión y al feto.

## 5. DISEÑO METODOLOGICO

### 5.1 LOCALIZACION

La investigación se realizó en la Granja Porcicola Villa Alejandra, ubicada en la vereda el Volador en el Municipio de Piedecuesta, Santander, situada a una altura promedio de 970 m. s. n. m, y temperatura promedio de 24°C, cuyas coordenadas son latitud 6° 57' 43.20" N y longitud 73° 2' 54.69" O.

En la granja mencionada se dispuso para la investigación cinco machos de las razas Pietrain, Pietrain \* Belga e híbridos y un laboratorio para manejo y procesamiento de las muestras.

### 5.2 METODOLOGIA

El estudio se realizó durante un periodo de 6 meses y su ejecución se dividió en dos etapas:

**5.2.1 Primera etapa: Fase de campo o experimental** En esta etapa, se realizó la colección, transporte y valoración de las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco; posteriormente se efectuaron las diluciones de acuerdo con los tratamientos dispuestos y se realizaron las valoraciones de calidad macroscópica y microscópica en diferentes intervalos de tiempo tras su dilución y refrigeración.

**5.2.1.1 Colección del material seminal** Se realizó la obtención del material seminal de acuerdo con la técnica de colección de Mano enguantada y que siguió estos pasos:

Lavar el macho y el prepucio con abundante agua

Dirigir el macho hacia el corral de toma de semen

Colocarse un guante de recolección y luego un guante plástico para realizar aseo al prepucio

Secar y evacuar el prepucio masajeando de atrás hacia delante

Permitir que el macho monte el potro

Previamente preparar el termo y el vaso de icopor el cual se acondiciona con filtro para semen fijado con liga de goma y se protege con papel aluminio y tapa

Cuando el macho monte el potro esperar a que desenvaine el pene, el operario debe quitarse el guante plástico y tomar el pene con ayuda de una servilleta estéril por la punta dejando libre el extremo para permitir la salida libre del semen, sin que este toque la mano.

Colectar en el termo solo la fracción rica (eyaculado cremoso y lechoso).  
Nunca se debe soltar el pene del macho  
La descarga termina cuando sale la última fracción, el pene pierde erección y comienza la retracción.  
Tapar el termo y llevarlo al laboratorio para la calificación del semen, en el menor tiempo posible.  
Dirigir el macho al corral adecuadamente reduciendo al máximo el stress en el animal.

**Figura 1. Procedimiento de colección del semen**



**5.2.1.2 Valoración de calidad del semen fresco** Previo a la dilución y como referente de calidad seminal se efectuó la valoración del semen fresco, para esto se determinaron sus características macroscópicas y microscópicas así:  
**Valoración macroscópica del semen fresco:**

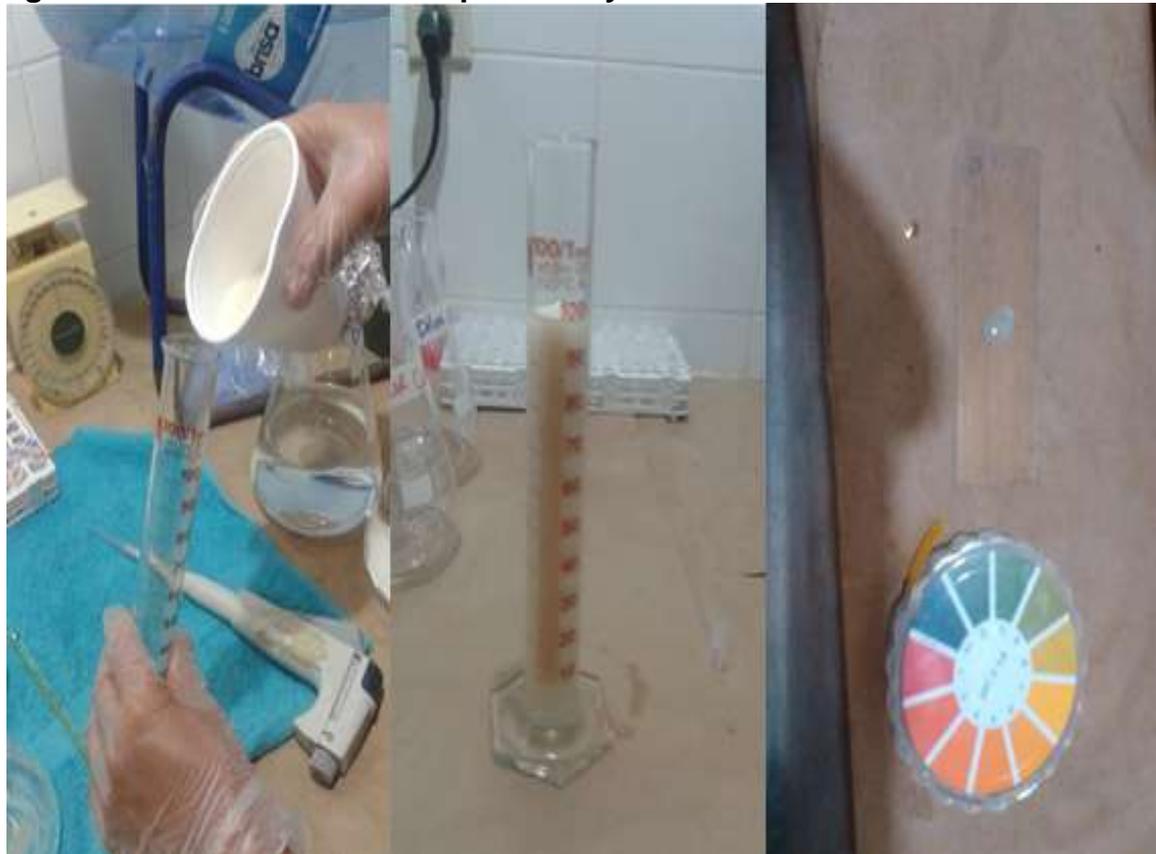
**Color:** su valoración fue cualitativa, en donde un color blanco cremoso represento una condición normal, y otras tonalidades correspondieron a un semen anormal.

**Olor:** su valoración fue cualitativa, en donde un eyaculado normal produce muy poco olor, y por el contrario un eyaculado que presente olor fuerte se considerado como anormal.

**Volumen:** su determinación fue cuantitativa, la cual se midió en mililitros de eyaculado.

**pH:** Se determinó por medio de tiras indicadoras.

**Figura 2. Valoración macroscópica del eyaculado**



### **Valoración microscópica en semen fresco**

**Motilidad:** Se realizó por medio de microscopia óptica de 10X. Su valoración fue un porcentaje de acuerdo a la proporción de espermatozoides que muestren un

movimiento progresivo. Su calificación es subjetiva y su escala de valoración está representada en la tabla 1.

**Tabla 1. Escala de motilidad**

Calificación	Características
0 a 20 %	Muy pocos espermatozoides presentan movimiento progresivo. Se observa gran cantidad sin movimiento
20 a 40 %	Una pequeña proporción de espermatozoides tienen movimiento progresivo, una cantidad mayor tiene movimiento oscilatorio
40 a 60 %	Una buena proporción de espermatozoides tienen movimiento pero de tipo circular o fijo, con una baja proporción de espermatozoides con movimiento progresivo
60 a 80 %	La mayoría de los espermatozoides muestran movimiento progresivo y vigoroso, pero de movimiento lento a través del campo
80 a 100%	La mayoría de los espermatozoides muestran movimiento progresivo y vigoroso

Fuente: Almond, Glen y otros. El libro de la inseminación artificial en el cerdo

**Tipo de movimiento:** Su calificación fue subjetiva y su escala de valoración está representada en la tabla 2.

**Tabla 2. Tipo de Movimiento**

Tipo de movimiento	Características
Tipo 0	Espermatozoides sin movimiento
Tipo 1	Espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre si mismos
Tipo 2	Espermatozoides con movimientos anormales y algunos progresivos.
Tipo 3	Espermatozoides con movimientos progresivos lentos y en zigzag.
Tipo 4	Espermatozoides con movimientos progresivos rápidos
Tipo 5	espermatozoides con movimientos progresivos muy rápidos

Fuente: Almond, Glen y otros. El libro de la inseminación artificial en el cerdo

**Aglutinaciones:** se evaluó la presencia de cuerpos extraños y aglutinaciones, su valoración está representada en la tabla 3.

**Tabla 3. Aglutinaciones**

Aglutinaciones	Características	Calificación
POCA	Menos de 2 aglutinaciones por campo	+
MEDIA	Entre 3 y 5 aglutinaciones por campo	++
ABUNDANTE	Mas de 5 aglutinaciones por campo	+++

Fuente: Almond, Glen y otros. El libro de la inseminación artificial en el cerdo

**Morfología espermática:** Se realizó junto con el HOST, registrando el porcentaje de espermatozoides anormales encontrados. Las anomalías más frecuentes son, Gota citoplasmática (distal y proximal), cabezas anormales (Asimétrica, Piriforme, Micro cabeza, Alargada), colas anormales (en látigo, enrollada, abaxial, doblada).

**Concentración:** su valoración fue cuantitativa y consiste en la determinación del número de espermatozoides por unidad de volumen. Esta medición se realizó por conteo en la cámara de Bürker de acuerdo con la siguiente metodología.

En un balón volumétrico de 100 ml, diluir 1 ml de semen puro en una solución de suero fisiológico formolado agregando 1 ml de semen y 99 ml de suero, agitar suavemente hasta obtener una solución homogénea.

Con una micropipeta tomar una gota de dilución y colocarla en el retículo de la cámara.

El conteo se realiza utilizando el microscopio con lente de 40X, se cuentan los espermatozoides encontrados dentro de 40 cuadros pequeños de la cámara.

La concentración espermática del eyaculado por milímetro cúbico es igual al total de espermatozoides contados por 10.000.

**Figura 3. Valoración de concentración – BURKER**



**Test hipoosmotico (HOST):** permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, para efectos de su valoración se desarrolló la siguiente metodología.

Se extraerán 2 alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra.

Estas muestras se introducirán en un tubo eppendorf que contendrán 900  $\mu\text{L}$  de una solución isosmótica (presión osmótica de unos 300 mOsm) o una solución hiposmótica (presión osmótica de unos 150 mOsm).

Los dos tubos con las soluciones se encontraran previamente calentadas en un baño maría a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

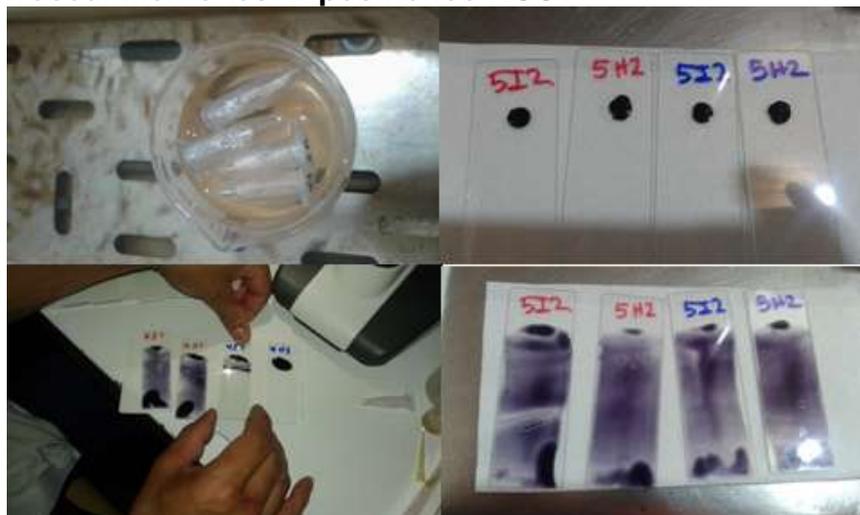
tras la adición de las muestras, los tubos se cerraran, se agitaran y se incubaran en el baño maría durante 10 a 15 minutos sin agitar.

Para mantener las muestras para su observación durante un periodo de tiempo prolongado, se realizara una tinción de los espermatozoides con la técnica de la eosina- nigrosina. Para ello, tras la incubación se extraerá una alícuota de 20 – 40  $\mu\text{L}$  de la suspensión espermática y se depositara en el extremo de un portaobjeto; a esta gota se le añadirá un volumen igual del colorante eosina – nigrosina y, con la punta de la pipeta, se mezclaran y se realizara una extensión con esta fracción.

La extensión se deja secar al aire y se puede observar inmediatamente en el microscopio de campo, preferentemente a 100 X.

En esta tinción, los espermatozoides viables, es decir, aquellos que presenta una membrana celular intacta, aparecerán de coloración más o menos blanquecina sobre un fondo purpura. Por el contrario, los espermatozoides y la membrana celular total o parcialmente alterada (espermatozoides no viables aparecerán coloreados en tonalidades purpura total o parcialmente)

**Figura 4. Procedimiento test hiposmótico HOST**



**5.2.1.3 Descripción de los tratamientos** Los tratamientos evaluados consistieron en la dilución del semen fresco en dos diluyentes uno de corta conservación y otro de larga conservación esto con el fin de evaluar el efecto que tiene la refrigeración en la calidad seminal bajo la influencia de estos diluyentes así:

Tratamiento 1 (Tx1): semen diluido en diluyente de corta conservación

Tratamiento 2 (Tx2): semen diluido en diluyente de larga conservación

Para el desarrollo de esta investigación, Se utilizaron dos diluyentes uno de corta conservación (Tx1) y otro de larga conservación (Tx2) de los cuales se desconoce su composición ya que por motivos comerciales se reserva esta información, sin embargo en su ficha técnica se da a conocer sus bondades y características así:

**Diluyente para periodo corto de preservación de semen (MerklIII Minitube)** La fórmula contiene antioxidantes que previenen el efecto nocivo de metabolitos en el medio de conservación, de esta manera garantiza la durabilidad del semen por un periodo de 4 días.

**Beneficios:** Es un diluyente ideal para periodos de conservación intermedios y mantiene la calidad del semen porcino por hasta 4 días; Contiene antioxidantes para prevenir el proceso de envejecimiento de las células espermáticas Optimiza los resultados de fertilidad durante las primeras 48 horas.<sup>36</sup>

**Diluyente para periodo largo de preservación de semen (Vitasem LD Magapor)** Solución basada en una fórmula desarrollada con la máxima garantía de calidad para minimizar los daños naturales producidos durante la conservación de las dosis seminales. La continuación de las capacidades tampón y antibacteriana, con la incorporación de sustancias con actividad antioxidante facilita el mantenimiento de la funcionalidad de las células espermáticas garantizando los resultados productivos, Utilización de las dosis seminales hasta 7 días después de su preparación.

**Características:**

Previene la aglutinación (EDTA)

Contiene sustancias que facilitan el aprovechamiento de la energía por parte de la mitocondria del espermatozoide

Combinación antibiótica que cubre un mayor espectro bacteriano

---

<sup>36</sup> MINITUBE. Ficha técnica MIII. [en línea]. Minitube Internacional. Germany:Minitube, 2013. [fecha de consulta: 05 de mayo de 2016] Disponible en: [http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13515-0083\\_Leaflet-MIII\\_es\\_131127.pdf](http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13515-0083_Leaflet-MIII_es_131127.pdf)

Incluye sustancias quelantes que favorecen la capacidad de conservación de la célula espermática

Capaz de regular y amortiguar los cambios de pH<sup>37</sup>

### **Dilución de semen según tratamientos**

Una vez efectuada la colección el semen se trasladó en el menor tiempo posible hacia el laboratorio, y seguido a esto se realizaron las diluciones según los tratamientos a evaluar así:

Se desinfectó el material usado en la dilución

Previo a la recepción del semen se calentó en el baño maría a 37°C 1000 cm<sup>3</sup> de agua destilada

En un Erlenmeyer de 1000 ml se vertió el contenido de un sobre de diluyente y asegurando que no contenga impurezas, se agregaron 500 cm<sup>3</sup> de agua destilada, se agitó hasta disolver totalmente el diluyente y obtener una solución de color transparente, se adicionaron los otros 500 cm<sup>3</sup> de agua destilada y se agitó nuevamente.

Se colocó el Erlenmeyer con la solución en el baño maría a 37°C y se reservó hasta la llegada del semen.

Para realizar las diluciones se realizó el cálculo de dosis posibles, considerando como concentración deseada  $3 \times 10^6$  espermatozoides de acuerdo con la fórmula.

$$\text{N}^\circ \text{ de dosis} = \frac{(A) \times 10.000 \times 1.000 \times (V)}{3 \times 10^6}$$

V = Volumen del eyaculado

A = Espermatozoides normales encontrados en cuarenta cuadros

Una vez conocido el número de dosis posibles se realizaron las diluciones de acuerdo con los siguientes pasos:

Cuando se tenga el número de dosis posibles, se multiplicara este número por 100, se restara luego el volumen de eyaculado obtenido y la diferencia será la cantidad de diluyente a utilizar.

Luego se medirá la cantidad de diluyente que se necesita asegurando que se encuentre a la misma temperatura del semen

Se adicionara el semen al diluyente en forma suave por las paredes del Erlenmeyer, y se moverá suavemente para homogenizar la dilución

---

<sup>37</sup> MAGAPOR S. L., Ficha técnica VitasemLD. [en línea] Magapor S.L. Saragoza, España: Magapor, 2003 [fecha de consulta: 05 de mayo de 2016] Disponible en: [http://www.magapor.com/images/PDFs/Products/EXTENDERS/SP\\_VITASEM\\_ago\\_2013.pdf](http://www.magapor.com/images/PDFs/Products/EXTENDERS/SP_VITASEM_ago_2013.pdf)

**Figura 5. Procedimiento de dilución de semen en los tratamientos**



**5.2.1.4 Valoración de calidad del semen diluido** Una vez efectuadas las diluciones se tomaron 6 alícuotas de 10ml de cada tratamiento para posteriormente realizar la valoración de las pruebas (pH) y microscópicas descritas con anterioridad en diferentes intervalos de tiempo así:

- t1: Correspondiente a la hora cero (0) tras diluir el semen
- t2: Correspondiente a la hora doce (12) tras diluir el semen
- t3: Correspondiente a la hora veinticuatro (24) tras diluir el semen
- t4: Correspondiente a la hora treinta y seis (36) tras diluir el semen
- t5: Correspondiente a la hora cuarenta y ocho (48) tras diluir el semen
- t6: Correspondiente a la hora sesenta (60) tras diluir el semen

**Figura 6. Alícuotas tomadas de los tratamientos**



**5.2.1.5 Almacenamiento de las muestras** Para reducir al máximo la degradación de las muestras almacenadas, se aseguró dentro del desarrollo de la metodología que los cambios de temperatura fueran escalonados y graduales así:

**Refrigeración de las muestras** Las alícuotas se dejaron atemperar al medio ambiente para su posterior refrigeración asegurando que el cambio de temperatura sea progresivo y gradual.

La etapa de refrigeración partió de una temperatura inicial de 37°C, luego se dejaron atemperar las muestras al medio ambiente durante dos horas y posteriormente se llevaron a refrigeración hasta alcanzar una temperatura de 15°C.

**Aclimatación de las muestras** Para el proceso de aclimatación se partió de una temperatura de 15°C tras la refrigeración, la muestra se llevó a temperatura ambiente (24 - 27°C) por un periodo de 15 minutos, posterior a esto se llevó a baño maría a temperatura de 37°C para realizar la valoración de calidad.

**5.2.2 Segunda etapa: Fase de análisis** En esta fase se analizaron los datos obtenidos en las tres colectas de semen realizadas con intervalos de 15 días a cinco cerdos; en cada colecta para el semen fresco se realizó su valoración macroscópica y microscópica; para el semen diluido en los dos tratamientos se realizó su valoración microscópica tras intervalos de tiempo a las 0, 12, 24, 36, 48, y 60 horas tras su dilución.

#### **5.2.2.1 Pruebas de valoración de calidad espermática**

##### **Valoración macroscópica**

Color  
Olor  
Volumen  
pH

##### **Valoración microscópica**

Motilidad  
Tipo de movimiento  
Aglutinaciones  
Morfología  
Concentración  
Test hipoosmótico (HOST)

**5.2.2.2 Diseño estadístico** El análisis de las variables microscópicas del semen diluido (Motilidad, Tipo de movimiento, Aglutinaciones, Morfología y Test hipoosmótico (HOST) se llevó a cabo a través de un Análisis de covarianza con un Modelo de medidas repetidas con dos factores y uno con medidas repetidas, las diferencias encontradas fueron comparadas a través de una prueba de t. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa, SAS V8, mediante la siguiente fórmula:

$$Y_{ijk} = \mu + \rho_i (\alpha_j) + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

en donde,

Factor A, Diluyente (2) =  $\alpha$

Factor B, Muestra (6) =  $\beta_k$

Sujeto, Cerdos (5) =  $\rho_i$

Respecto a las variables macroscópicas y microscópicas del semen fresco se empleó un análisis descriptivo.

## 6. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las variables analizadas se presentan de manera individual para facilitar su análisis, así mismo los individuos experimentales que corresponden a la variable independiente se designan por números desde el 1 al 5, y sus características se designan en la tabla 4.

**Tabla 4. Características de los Individuos experimentales**

NUMERO	RAZA	EDAD (Años)
Cerdo 1	Pietrain	3.5
Cerdo 2	Pietrain * Belga	1.5
Cerdo 3	Pietrain * Belga	1.5
Cerdo 4	Pietrain	1
Cerdo 5	Pietrain	1

### 6.1 PRUEBAS DE VALORACION ESPERMATICA DEL SEMEN FRESCO

**6.1.1 Variables macroscópicas** Las características macroscópicas evaluadas fueron: color, olor, pH y volumen. Estas se valoraron en forma subjetiva, con excepción del pH y del volumen de acuerdo con la metodología propuesta, en la tabla 5 se muestran los resultados promedio obtenidos para las variables macroscópicas de las muestras de semen fresco.

**Tabla 5. Variables macroscópicas del semen fresco**

Variable	Valoración promedio	Desviación
Color	N	---
Olor	N	---
Volumen (ml)	124	33,02
pH	9,2	0,4

**6.1.1.1 Color** Se determinó para variable color una condición normal como se indica en la tabla 5 y que corresponde a un color blanco cremoso, determinación que coincide con lo reportado por Daza, 1992 y Rúgeles et al, 2013<sup>38</sup>. Así mismo podemos asumir desde la variable estudiada que el semen es de buena calidad.

<sup>38</sup> RUGELES-PINTO, C, CAICEDO-TORO, R, VERGARA-GARAY, O, LINARES-ARIAS, J, ALMENTERO-SUÁREZ, C, Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. [en línea]. 2013, vol. 23, no. 3. [consultado: 4 de marzo de 2016], pp. 208. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95926665007>>

**6.1.1.2 Olor** En la valoración de la característica olor, no se detectaron olores distintos al característico en el total de muestras, lo cual corresponde a un valor normal, tal como se indica en la tabla 5, valoración que coincide con lo reportado por Daza, 1992 y Rúgeles et al, 2013.

**6.1.1.3 Volumen** En la figura 7. Se presentan los valores obtenidos para la variable volumen del eyaculado de los cerdos evaluados, la cual fue de  $124 \pm 33,02$  ml como lo indica la tabla 5, valor que es similar al reportado por Henao et al y Fuentes et al<sup>39</sup>; en estudios realizados en condiciones de bosque húmedo tropical quienes señalan valores de  $146 \pm 13,01$  ml como normales; por otro lado Rúgeles et al, 2013 reportan volúmenes superiores de 210 ml.

Entre los individuos evaluados el cerdo número 3, reporta un volumen superior, pero a la vez presenta la mayor desviación y el cerdo número 4 reporta los valores más bajos para volumen. Comportamiento que coincide con otras investigaciones en donde se presentó alta variación entre eyaculados de diferentes cerdos y entre los del mismo cerdo (Fuentes et al., 1992; Trudeau y Sanford, 1986; Mazzarri y Fuentes, 1978; Wettermann et al., 1976; Singleton y Shelby, 1972)<sup>39</sup>.

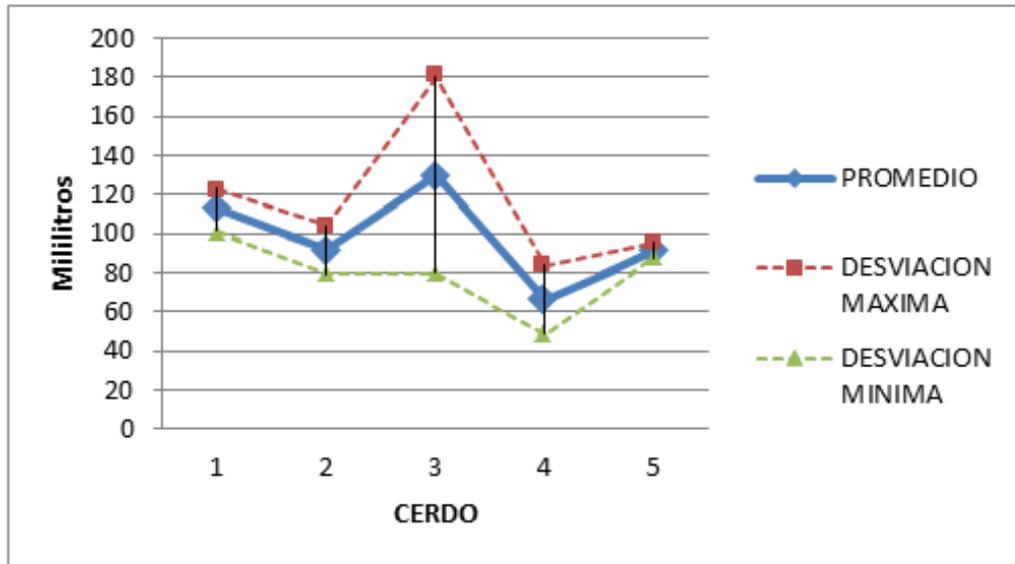
El volumen seminal depende según lo descrito por (Cooper, 1980) del tamaño de las glándulas accesorias, y de la cantidad de estímulo sexual previo a la recolección; Sin embargo (Strzezek et al., 2000; Rodríguez y Wallgren, 2000) reportaron que la frecuencia de las recolecciones presenta una correlación inversa con el volumen de los eyaculados; factor que para este estudio no representa una influencia significativa, ya que los individuos experimentales compartieron condiciones de uso y periodo de recuperación. Así mismo el valor reportado corresponde al de la fracción espermática del eyaculado.

En condiciones de uso del material seminal es conveniente un valor alto para el volumen del eyaculado ya que de esta valoración depende el número de dosis a utilizar sin dejar de lado la apreciación de la concentración espermática del eyaculado tal como lo describen Tardif et al., 1999 quienes consideran que el volumen no está relacionado con la fertilidad; pero si condiciona el número de espermatozoides y por tanto el número de dosis del eyaculado.

---

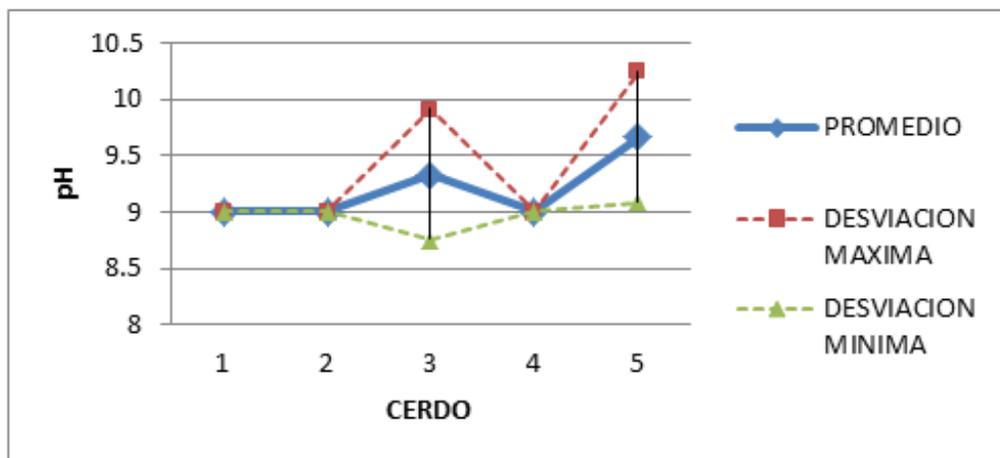
<sup>39</sup> HENAO RESTREPO, Guillermo et al. Efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical. [en línea]. 2004, vol.57, no.2 [citado el 2016-03-04], pp. 2355-2372. Disponible en: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S030428472004000200001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030428472004000200001&lng=en&nrm=iso)>.

La figura 7. Volumen del eyaculado en ml



**6.1.1.4 pH** La determinación de pH arrojó un valor de  $9,2 \pm 0,4$  para las muestras evaluadas tal como se indica en la tabla 5, el cual es superior a lo reportado en la literatura; Rúgeles, reporta valores para pH de 8,3 y Gadea, valores de  $7,4 \pm 0,2$ . El valor obtenido se atribuye a la baja precisión que tiene el método utilizado para su determinación. En la figura 8, se presentan los valores para pH de los machos evaluados.

Figura 8. Valores de PH de los eyaculados.



**6.1.2 Variables microscópicas** Las características microscópicas evaluadas fueron: Motilidad, Tipo de movimiento, Aglutinaciones, Morfología, Concentración, y Test hipoosmotico (HOST). Estas se valoraron por medio de microscopia óptica, en la tabla 5 se muestran los resultados promedio obtenidos para las variables macroscópicas de las muestras de semen fresco.

Los resultados obtenidos, sirven de referencia en la comprensión del efecto que tiene la refrigeración en el semen diluido.

**Tabla 6. Variables microscópicas del semen fresco**

Variable	Valoración promedio	Desviación
<b>Motilidad (%)</b>	97	1,47
<b>Tipo de movimiento</b>	4.6	0,21
<b>Aglutinaciones</b>	0	0,48
<b>Morfología</b>	3,06	1,22
<b>Concentración</b>	3,2X10 <sup>8</sup>	9,8 X10 <sup>7</sup>
<b>Test hiposmótico (HOST)</b>	23,93	14, 26

**6.1.2.1 Motilidad** La valoración del porcentaje de motilidad fue en promedio de 97%±1,47 tal como se reporta en la tabla 6, valor similar al reportado por Henao et al, quien determino un valor de 94.1%, Hernández et al, reporto motilidad del 90% para una muestra de semen que fue colectada y procesada dentro de la granja<sup>40</sup>, otros autores reportan valores inferiores Mejía 2010, estimo un porcentaje de motilidad del 85±0.1; en pruebas pre congelamiento<sup>41</sup>, Rúgeles reporta un valor de 72,4<sup>47</sup> y Gadea et al 2005, reporta valores para motilidad de semen fresco de 84.06 ± 1.65.<sup>42</sup>

Para efectos de valoración de la característica motilidad y de acuerdo con lo reportado por Hernández et al, se considera satisfactorio un porcentaje superior al 60% para ser usado en inseminación artificial. (Tardif et al., 1999).<sup>48</sup> considera

<sup>40</sup> HERNANDEZ, P.J.E.; FERNANDEZ, R.F y MEJIA, R.A.I. Efecto de la monta natural y el uso de diferentes tipos de semen sobre la productividad de la cerda. [online]. 2008, vol. 30, no.2 [citado 2016-03-06], pp. 101. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253570X2008000200005&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2008000200005&lng=es&nrm=iso)>.

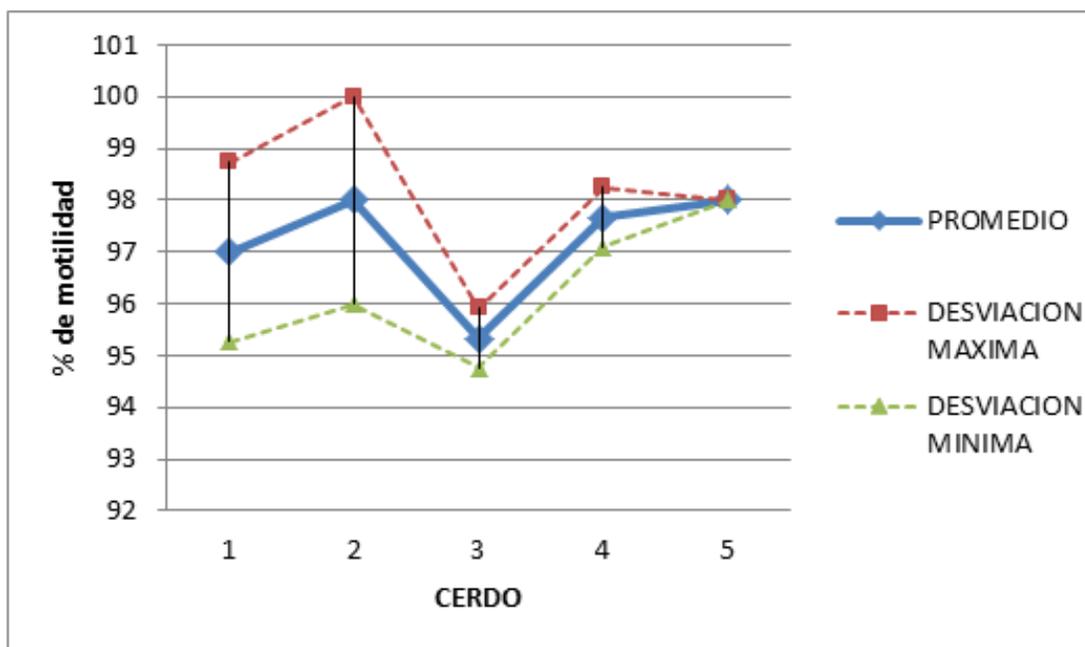
<sup>41</sup> MEJIA, A. Efecto de la concentración espermática de semen Porcino sobre sus características post - descongelamiento. Trabajo de grado Maestría en biotecnología. Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2010. p. 25.

<sup>42</sup> GADEA, et al. Cooling and Freezing of Boar Spermatozoa: Supplementation of the Freezing Media With Reduced Glutathione Preserves Sperm Function. En: Journal of Andrology. Mayo a junio, 2005, vol. 26 no.3,. p. 399.

que La movilidad individual es una de las características más indicadoras de la capacidad fertilizadora in vivo de una muestra de semen; información que confirma Hernández et al, quien considera que la motilidad espermática es una valoración significativa por su correlación positiva con la tasa de parición y número de lechones nacidos hecho que logro comprobar en su investigación.

En la figura 9, se puede apreciar el comportamiento de la variable motilidad en cada uno de los individuos experimentales; en donde los cerdos 2 y 5 presentaron el mejor comportamiento con un porcentaje de motilidad de 98,7 y 98,2 respectivamente, por otro lado el cerdo 3 presento la menor motilidad.

**Figura 9. Porcentaje de motilidad del eyaculado fresco**

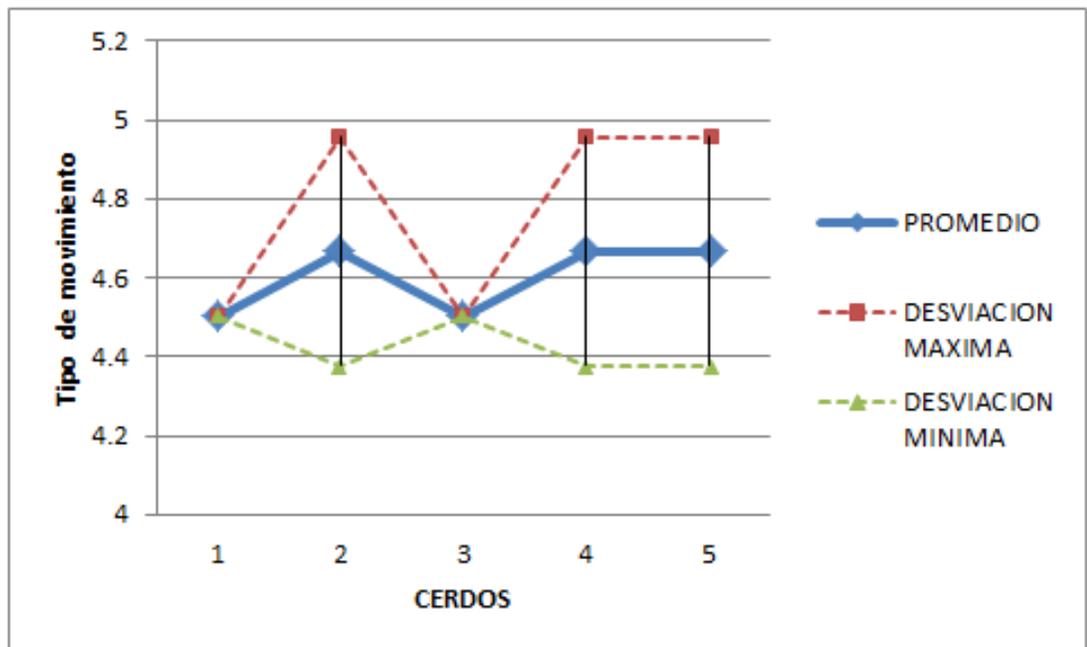


**6.1.2.2 Tipo de movimiento** La determinación de la variable tipo de movimiento, es una apreciación subjetiva y su determinación se efectuó según lo descrito en la tabla 2; que para esta investigación tuvo un valor promedio de  $4.6 \pm 0,21$  lo que corresponde a muestras con movimientos progresivos rápidos y movimientos progresivos muy rápidos; valor superior a lo reportado por Rueda et al, 2009 quien reporto  $4,1 \pm 0,05$ <sup>43</sup>. En la figura 10. Se presentan los resultados

<sup>43</sup> MADELYN RUEDA, R. PERDIGÓN, TERESA ARIAS, D. MENDOZA, J.A. BENÍTEZ, C. LEMUSY M. TOSAR. Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubano DICIP. [en línea], 2009, Vol.16, no. 1[citado el 13 marzo 2016], pp. 28. disponible en [http://www.iip.co.cu/R CPP/201/201\\_06MJAcosta.pdf](http://www.iip.co.cu/R CPP/201/201_06MJAcosta.pdf)

para la variable tipo de movimiento de los individuos experimentales en donde de manera colectiva observamos muestras con tipo de movimiento sobresalientes y aceptables para ser usados en inseminación artificial.

**Figura 10. Tipo de movimiento del eyaculado**



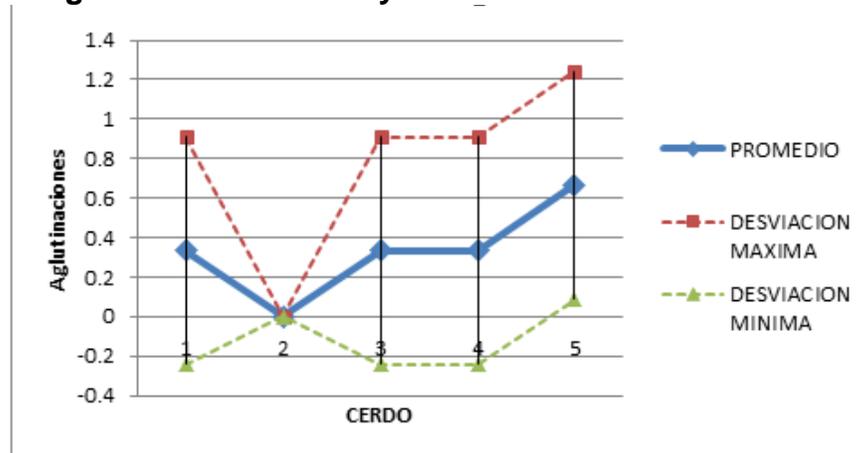
**6.1.2.3 Aglutinaciones** La valoración se realizó por medio de microscopia óptica de 40X, en donde se registró la presencia de aglomeraciones y/o aglutinaciones y se valoró de acuerdo con lo descrito en la tabla 3. El valor promedio encontrado fue de  $0 \pm 0,48$ , teniéndose una valoración de poca aglutinación. Lo que representa una baja incidencia de aglutinaciones en los machos usados en la investigación.

Según Díaz et al, 2008, la aglutinación espermática es un factor limitante de la motilidad y puede ser inducida por: acción del cAMP (adenosin monofosfato cíclico) sobre la concentración externa de  $Ca^{2+}$  (Harayama et al., 2003), presencia de plasma seminal (Schmidt & Kamp, 2004) o contaminación bacteriana, fúngica o presencia de esteroides (Berger et al., 1989; Briz et al., 1995; Flowers, 2004)<sup>44</sup>.

<sup>44</sup> DIAZ, O. MESA, H. GOMEZ G, HENAO, F, J. Evaluación in vitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. [En línea] 2008, vol. 3, no. 1. [Citado el 13 de marzo de 2016], pp. 36. disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Orlando\\_Diaz\\_Franco/publication/255908765\\_Evaluacin\\_in\\_vitro\\_de\\_la\\_viabilidad\\_del\\_semen\\_porcino\\_hasta\\_120\\_h\\_de\\_almacenamiento\\_en\\_refrigeracin/links/00b7d520d670887034000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Orlando_Diaz_Franco/publication/255908765_Evaluacin_in_vitro_de_la_viabilidad_del_semen_porcino_hasta_120_h_de_almacenamiento_en_refrigeracin/links/00b7d520d670887034000000.pdf)

De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que el proceso de colección realizado fue de óptima calidad, ya que se redujo la contaminación durante y después de la colección y se garantizaron las condiciones sanitarias de los individuos experimentales resultado que se puede valorar en la baja incidencia de aglutinaciones en los eyaculados.

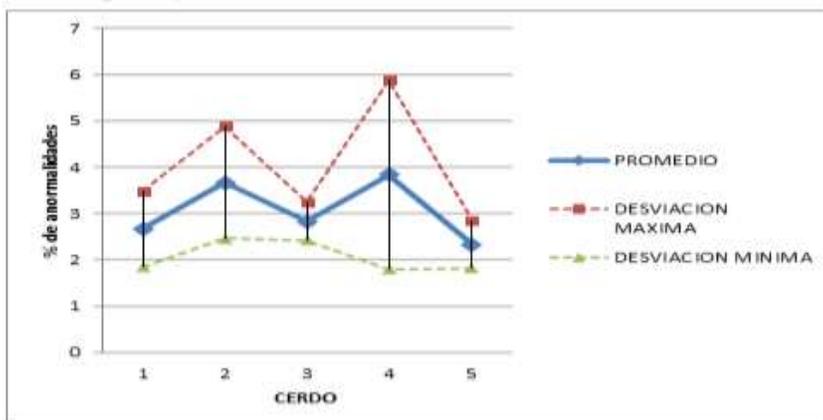
**Figura 11. Aglutinaciones en el eyaculado**



**6.1.2.4 Morfología** La valoración de morfología se realizó, junto con el test hiposmótico HOST, en donde se registró el porcentaje de espermatozoides anormales; la valoración promedio fue de  $3,06 \pm 1,22$  como se indica en la tabla 6, en donde predominaron las anomalías de cola (enrollada y doblada), y cabeza (micro cabeza). Valor similar a lo reportado en la literatura, Acosta et al, 2007, encontró comparando las técnicas espermiograma y acrosomía, usadas en la determinación de morfo anomalías un porcentaje de acrosomas normales de 97 y 100% y desde 72 hasta 98% respectivamente; así mismo reporto valores similares a los encontrados por Flowers (1997) y por Larsson y Flowers (citados por Rozeboom 2001), que describen valores entre 86 y 90% de acrosomas normales post recogida<sup>45</sup>. En la figura 12, se presenta los valores para morfología espermática de los individuos experimentales.

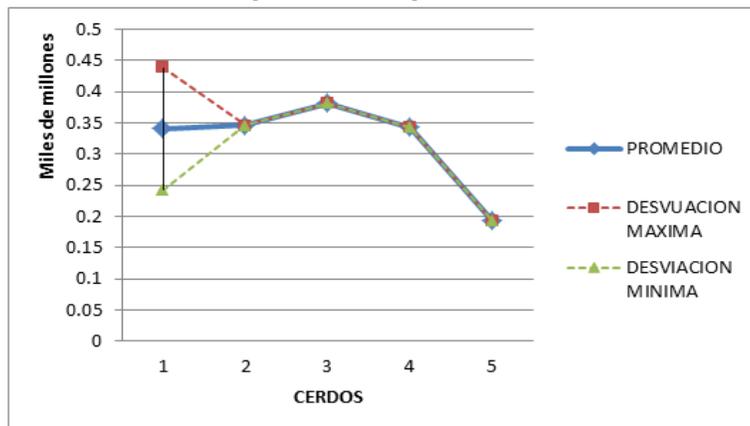
<sup>45</sup> ACOSTA, M. RUEDA, M. PERDIGON, R. Comparación de dos técnicas en la determinación de morfo anomalías del semen porcino. [On line]. 2007, vol. 25. [citado el 13 de marzo de 2016], pp. 38. disponible en: [https://www.google.com.co/?gws\\_rd=ssl#q=ACOSTA%2C+M.+RUEDA%2C+M.+PERDIGON%2C+R.+Comparaci%C3%B3n+de+dos+t%C3%A9cnicas+en+la+determinaci%C3%B3n+de+morfo+anomal%C3%ADas+del+semen+porcino.](https://www.google.com.co/?gws_rd=ssl#q=ACOSTA%2C+M.+RUEDA%2C+M.+PERDIGON%2C+R.+Comparaci%C3%B3n+de+dos+t%C3%A9cnicas+en+la+determinaci%C3%B3n+de+morfo+anomal%C3%ADas+del+semen+porcino.)

**Figura 12. Morfología espermática**



**6.1.2.5 Concentración** La valoración de concentración espermática se realizó por conteo en la cámara de Burker, en la tabla 6, se presenta el valor promedio encontrado el cual fue de  $3,2 \times 10^8 \pm 9,8 \times 10^7$ , valor que es superior a lo reportado por Rueda M, 2009 quien no encontró diferencias significativas con respecto a la concentración de espermatozoides de sementales de granjas especializadas comparado con el de sementales de granjas de autoconsumo reportando valores de 281 células  $\times 10^6/\text{ml}$  y 303 células  $\times 10^6/\text{ml}$ .<sup>46</sup>

**Figura 13. Concentración espermática por ml**



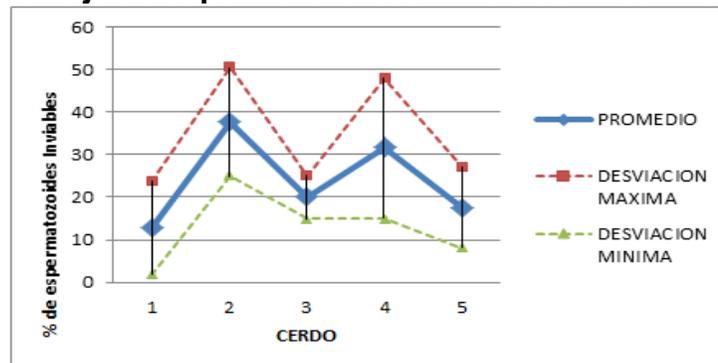
**6.1.2.6 Test hipoosmótico (HOST)** La determinación de funcionalidad plasmática que se realizó arrojó para los individuos experimentales un promedio

<sup>46</sup> MADELYN RUEDA 1, R. PERDIGÓN1, TERESA ARIAS, D1. MENDOZA, J.A1. BENÍTEZ, C1. LEMUSY M2. TOSAR2. Óp. Cit.

de espermatozoides inviábiles de  $23,93 \pm 14.26$ , valor que comparado con lo obtenido en la determinación de motilidad representa un valor más aproximado de la viabilidad espermática y por tanto de su capacidad fecundante; Salisbury et al. (1978) indica que la subjetividad del examen de motilidad espermática de semen hace que muchas veces la correlación con la fertilidad sea baja, a pesar de ser un parámetro ampliamente utilizado en los centros de inseminación. Por otro lado, las pruebas de tinción (eosina-nigrosina) producen información concerniente a la integridad de membrana espermática de la cabeza, dando mayor información de la viabilidad espermática (Chan et al., 1991)<sup>47</sup>.

Díaz et al, 2009 reporta valores de acrosoma íntegro y liso en cerdos jóvenes, maduros y viejos de  $85,9 \pm 1,3$ ,  $85,5 \pm 1$ ,  $85,5 \pm 2,3$  respectivamente, valores inferiores a los encontrados en esta investigación<sup>48</sup>; Turba et al, 2007 reporto porcentajes de acrosomas íntegros desde 72,3% hasta 98,5%<sup>49</sup>, valores similares a los encontrados, los cuales se consideraron como aceptables para ser usado en inseminación artificial. La figura 14 representa el porcentaje de espermatozoides inviábiles encontrados en el test HOST.

**Figura 14. Porcentaje de espermatozoides inviábiles – test HOST**



<sup>47</sup> CARPIO C., M; CADILLO C., J y MELLISHO S., E. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. [online]. 2008, vol.19, no.1 [citado 2016-03-15], pp. 17. Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S160991172008000100003&lng=es&nr=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160991172008000100003&lng=es&nr=iso)>.

<sup>48</sup> DIAZ FRANCO, Orlando et al. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplásmicas persistentes. [online]. 2009, vol.19, no.5 [citado 2016-03-15], pp. 503. Disponible en: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S07982592009000500010&lng=es&nr=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S07982592009000500010&lng=es&nr=iso)>

<sup>49</sup> TURBA, M. FANTINATI, P. BERNARDINI, C. GENTILINI, F. BACCI, M. FORMI, M. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. [En línea]. [Bologna, Italia]: Animal Reproduction Science, Mayo de 2007, [citado el 15 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713139>

## 6.2 PRUEBAS DE VALORACION ESPERMATICA DEL SEMEN DILUIDO

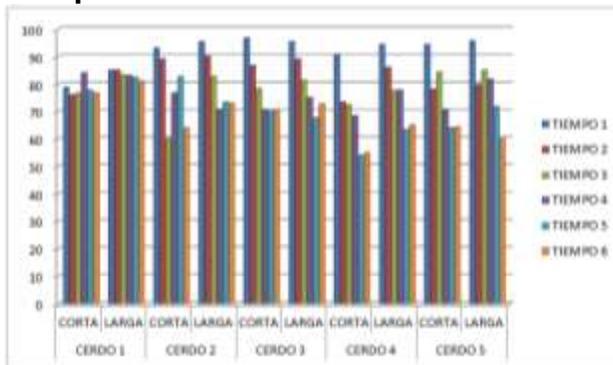
Con el fin de evaluar el efecto que tiene el uso de dos diluyentes uno de larga conservación y otro de corta conservación en las características de valoración de calidad espermática en distintos periodos de preservación tras su dilución, se efectuó una valoración microscópica de las muestras de semen diluido en la hora 0, 12, 24, 36, 48, 60 tras su dilución.

**6.2.1 Valoración microscópicas** Las valoraciones realizadas para semen diluido fueron motilidad, tipo de movimiento, aglutinaciones, morfología y test hiposmótico (HOST).

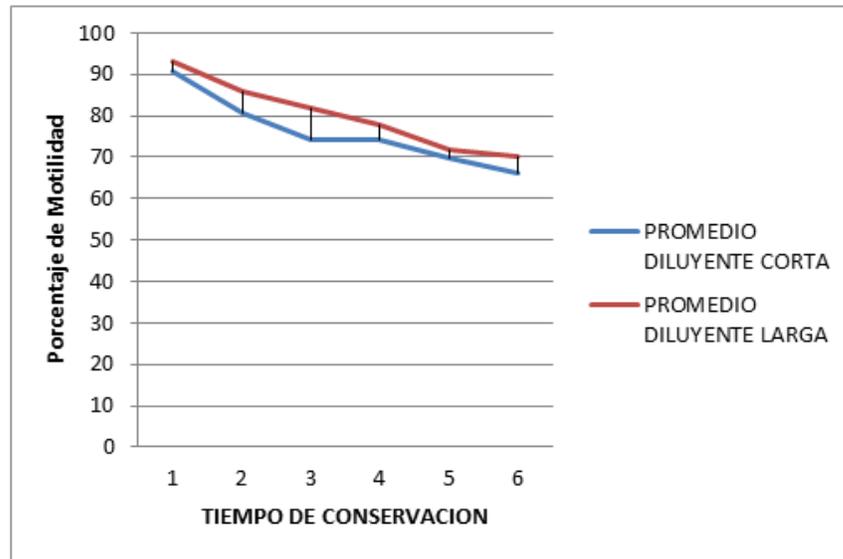
**6.2.1.1 Motilidad semen diluido** En la valoración realizada, no se encontraron diferencias significativas en el promedio de motilidad en los dos tratamientos, tal como lo indica la figura 16, mas sin embargo es ligeramente superior en presencia del diluyente de larga conservación; Así mismo se evidencio que el comportamiento del valor de motilidad en el transcurso del tiempo es independiente de su valor inicial, tal como se presenta en la figura 15.

En el transcurso del tiempo de almacenamiento se evidencia el declive progresivo que presenta la motilidad. En el comportamiento individual de los individuos experimentales, podemos observar que el cerdo 4 obtuvo valores de motilidad por debajo del mínimo esperado para ser utilizado en IA a las 48 y 60 horas tras su dilución con diluyente de corta conservación; de otro lado, el cerdo 1 mantuvo en el tiempo su motilidad, teniendo el mayor valor de motilidad tras 60 horas de refrigeración. En los demás individuos se presenta un declive progresivo sin sobrepasar el límite mínimo de motilidad.

**Figura 15. Motilidad espermática de semen diluido**

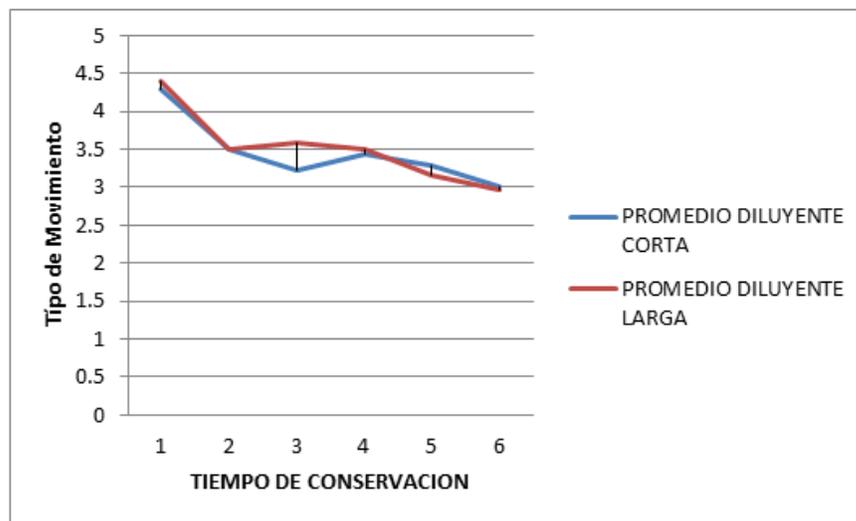


**Figura 16. Promedio de motilidad tratamiento / cerdo**



**6.2.1.2 Tipo de movimiento** No se encontraron diferencias significativas en la variable tipo de movimiento en los dos tratamientos, tal como lo indica la figura 17, también se evidencio que el valor inicial del movimiento afecta la variación que pueda darse en el tiempo.

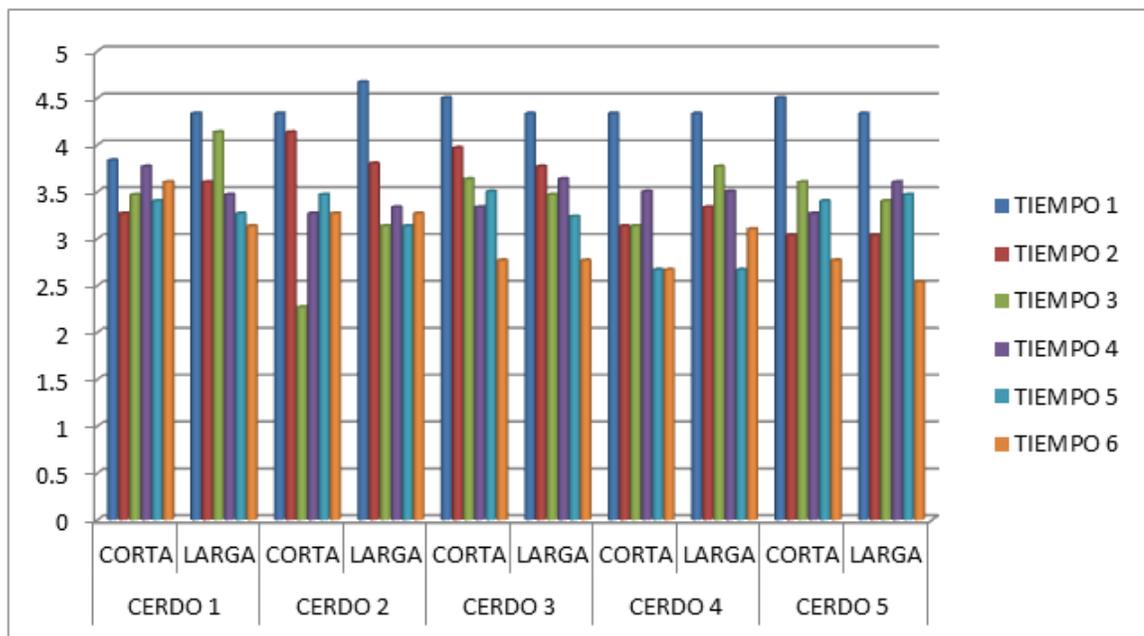
**Figura 17. Tipo de movimiento tratamiento / cerdo**



En la figura 18, se presenta el tipo de movimiento encontrado en los individuos experimentales en distintos tiempo de valoración.

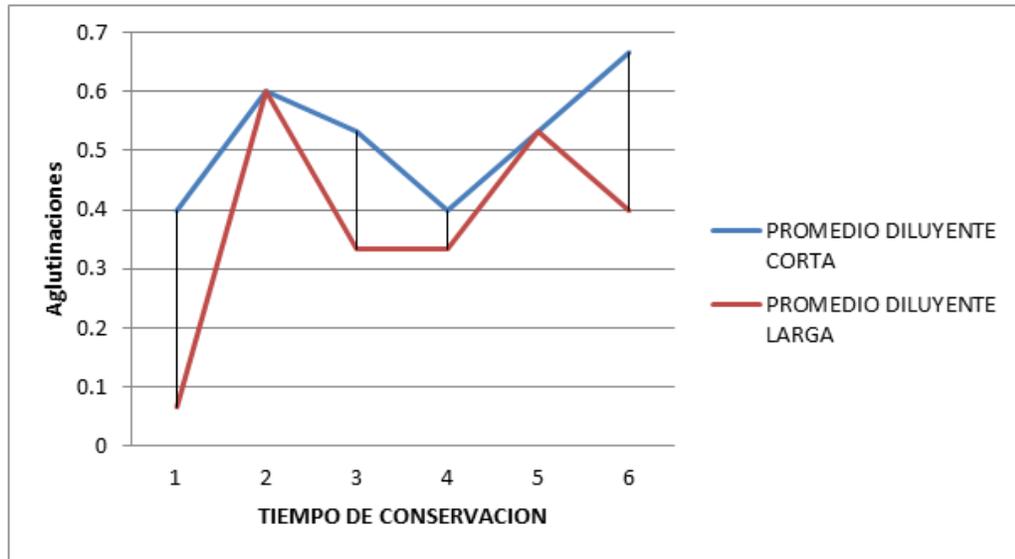
Se observa el descenso en la calidad de tipo de movimiento con el transcurso del tiempo de almacenamiento; encontrándose movimientos tipo 5 y 4 para las 0 y 12 horas tras su dilución, movimientos que corresponden a espermatozoides con movimientos progresivos rápidos y muy rápidos y tipo 2 y 3 a partir de la hora 24 tras la dilución que corresponden a espermatozoides con movimientos anormales y algunos progresivos y espermatozoides con movimientos progresivos y en zigzag respectivamente. De manera individual el cerdo 1 continúa manteniendo constante la valoración de tipo de movimiento siendo el de la mayor valoración tras 60 horas de preservación.

**Figura 18. Tipo de movimiento de semen diluido**

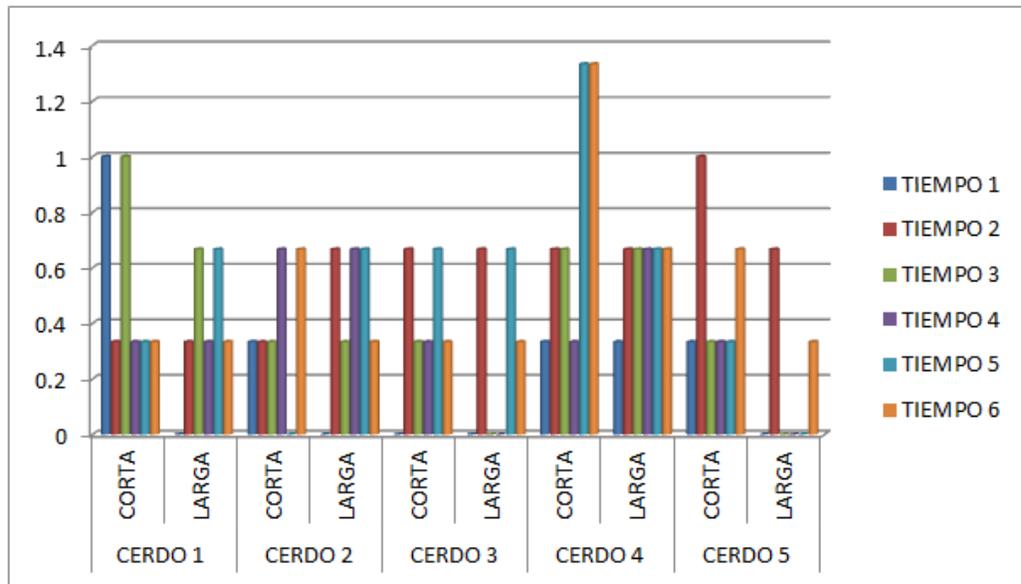


**6.2.1.3 Aglutinaciones** No se encontraron diferencias significativas en la variable aglutinación en los dos tratamientos, pero se observa una mayor incidencia de aglutinaciones con el diluyente de corta conservación tal como lo indica la figura 19; así mismo se puede apreciar en la figura 20 las aglutinaciones de los individuos experimentales en donde no existe una tendencia clara de la variable, lo que sugiere que la valoración de aglutinaciones no está directamente influenciada por el tiempo de conservación, además se puede inferir de los promedios reportados de los individuos experimentales, una poca incidencia de aglutinaciones en los eyaculados, condición que favorece su utilización en la inseminación artificial y que ratifica la calidad de reproductores que se maneja en la granja, como también de proceso de colección y tratamiento adecuado del material colectado.

**Figura 19. Aglutinaciones tratamiento / cerdo.**



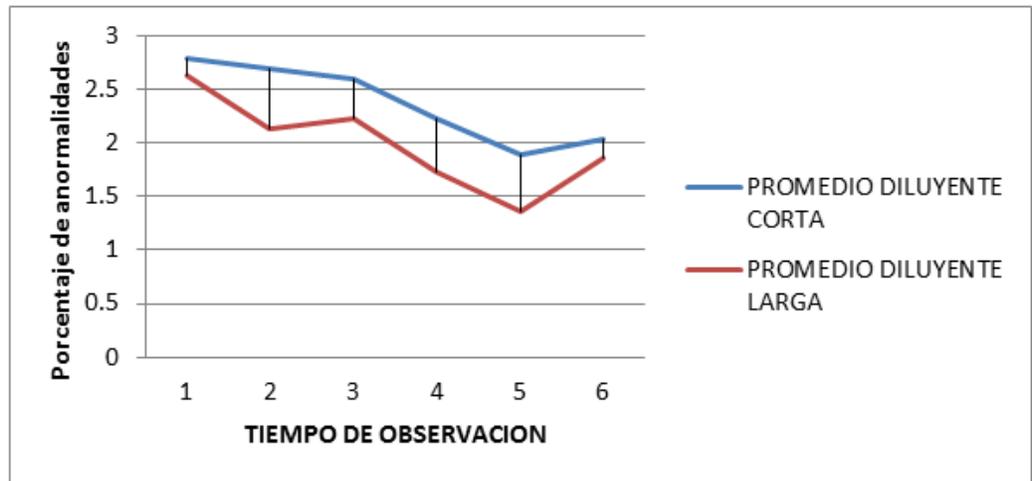
**Figura 20. Aglutinaciones del semen diluido**



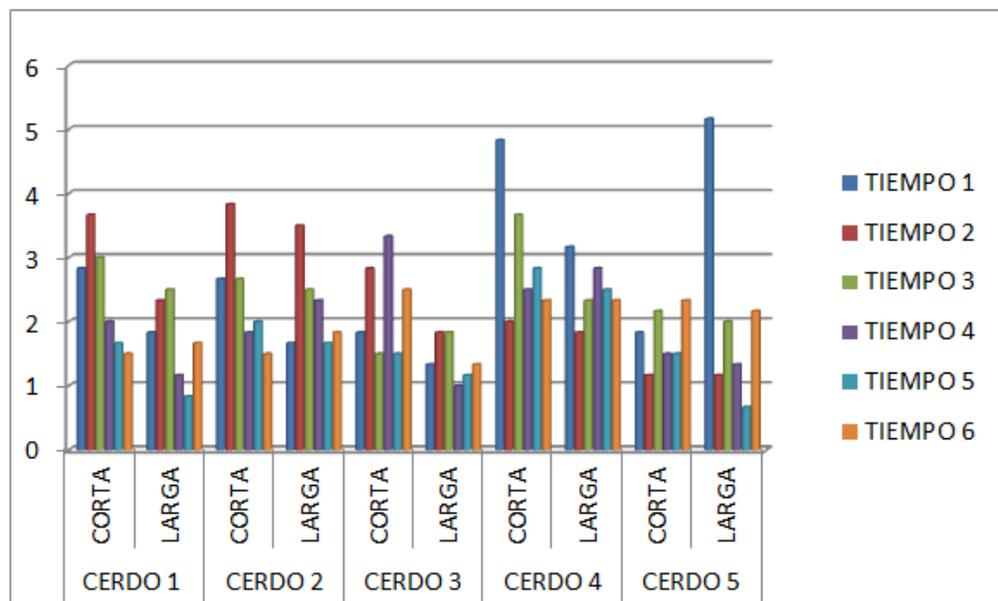
**6.2.1.4 Morfología** No se encontraron diferencias significativas para la variable morfología entre tratamientos, pero se observa una ligera superioridad de presencia de anomalías con diluyente de corta conservación, tal como se observa en la figura 21, Al valorar los promedios de los individuos experimentales

en los diversos tiempos estudiados, se observan diferencias entre individuos en donde el cerdo 4 presenta el mayor porcentaje de anomalías, mas no se observa una tendencia en el tiempo, lo que sugiere que las características asociadas a morfología se mantienen e inclusive decrecen con la conservación.

**Figura 21. Morfología por tratamiento**



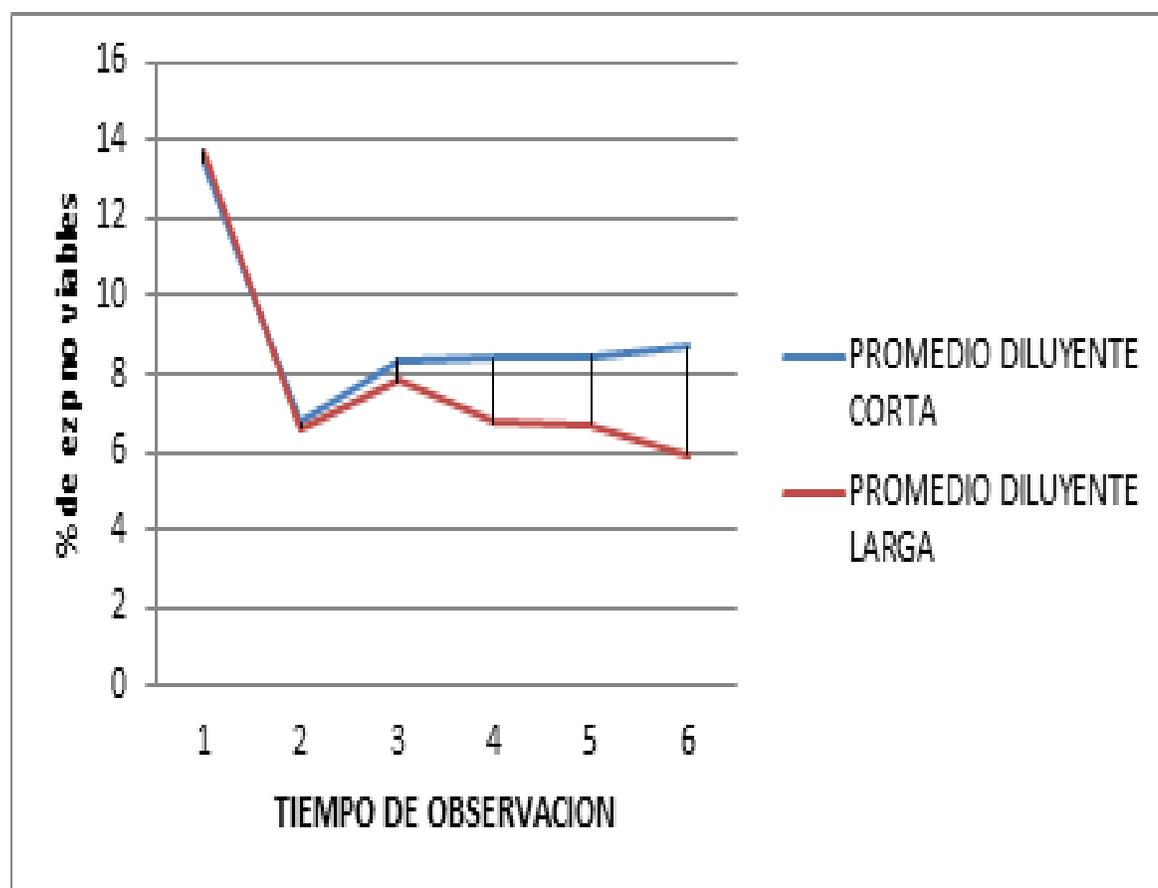
**Figura 22. Morfología semen diluido**



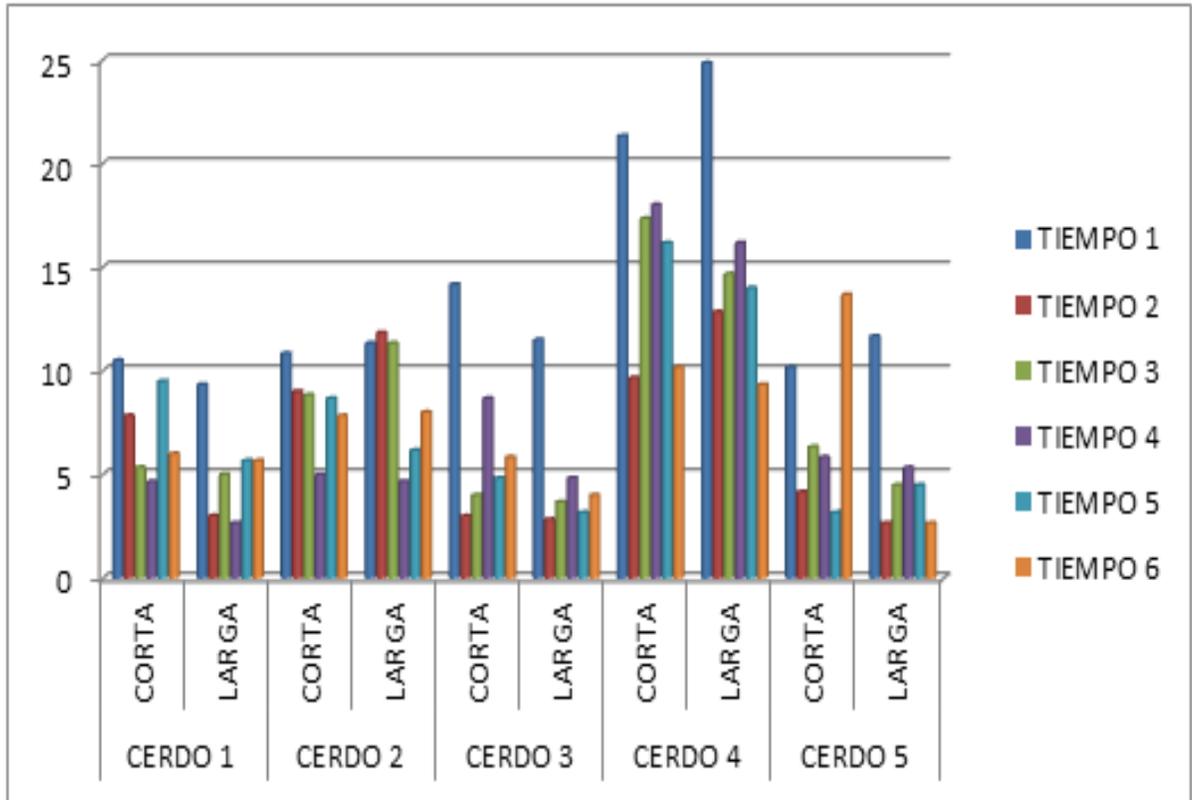
**6.2.1.5 Test hipoosmotico (HOST)** La determinación de la funcionalidad de la membrana se efectuó por medio del Test hipoosmotico (HOST), metodología que se desarrolló en presencia de una solución hipoosmótica y otra isosmótica. Analizando el factor Test, no se encontraron diferencias significativas entre soluciones isosmóticas e hipoosmótica en la determinación del porcentaje de espermatozoides inviables; analizando a través del tiempo se presentan diferencias significativas en el promedio de la cantidad de anomalías de espermatozoides, tal como se evidencia en la figura 23.

En la figura 24. Se presentan los promedios de los individuos experimentales a través del tiempo en donde contrario a lo que se esperaba el comportamiento de la variable tiende a decrecer al avanzar el tiempo de conservación. De manera individual el cerdo 4 fue quien registro la mayor cantidad de anomalías en el HOST.

**Figura 23. Test Hipoosmótico (HOST) por tratamiento**



**Figura 24. Test hipoosmótico (HOST) de semen diluido**



La valoración de los individuos experimentales indica que corresponden a un grupo de reproductores que en general presentan eyaculados de buena calidad,

En la determinación de variables para semen fresco se observó que el cerdo 3 presenta un volumen de eyaculado superior con un bajo porcentaje de espermatozoides anormales, mientras que el cerdo 4 presentó un menor porcentaje de motilidad y una alta incidencia de células inviables determinadas en el HOST; una vez diluido el comportamiento en el cerdo 4 es inferior al del grupo de reproductores para motilidad, morfología y presencia de espermatozoides inviables HOST; el cerdo 1 por su parte reporta índices aceptables en todas las variables y presenta una tendencia a sostener estas valoraciones en el tiempo principalmente en la motilidad.

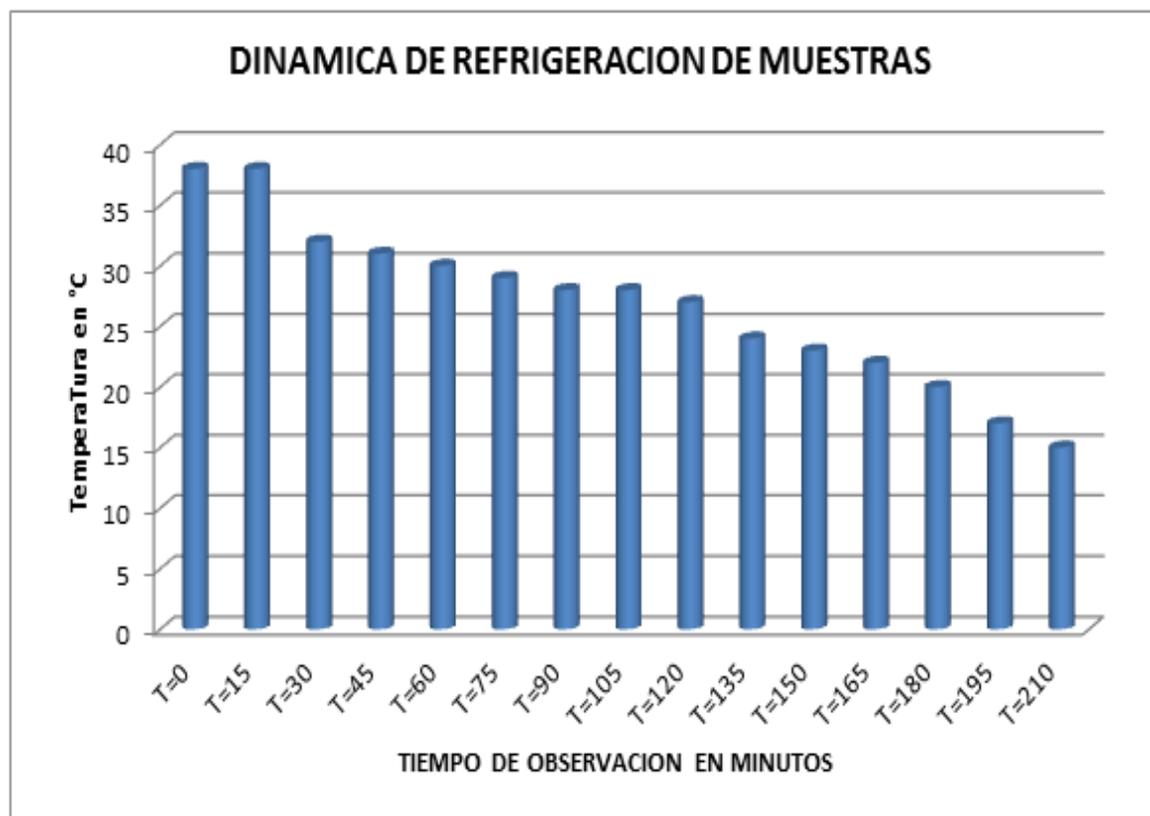
Si bien existe diferencias entre los reproductores, el cerdo 4. Es el único que en presencia de diluyente de corta conservación a la hora 60, no alcanza los valores mínimos para ser usado en inseminación artificial, condición que puede deberse a que es un cerdo joven y se encuentra empezando su uso como reproductor.

Es importante también reconocer que si bien no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, las valoraciones realizadas en presencia de diluyente de corta conservación estuvo porcentualmente por debajo de lo reportado por muestras en presencia del diluyente de larga observación, además si evaluamos desde el punto de vista económico y de disponibilidad, el primer diluyente en mención tiene un costo superior, y no se comercializa en la región.

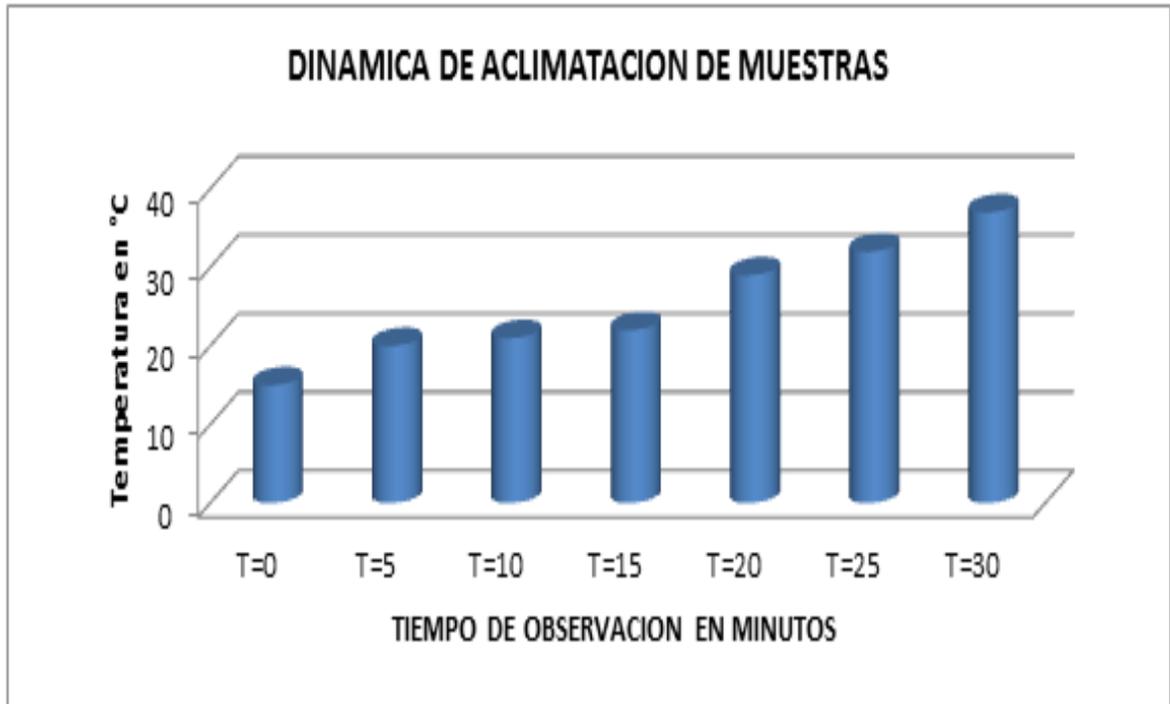
### 6.3 DINAMICA DE REFRIGERACION Y ACLIMATACION DE LAS MUESTRAS

Para reducir al máximo la degradación de las muestras almacenadas, se aseguró dentro del desarrollo de la metodología que los cambios de temperatura fueran escalonados y graduales; en la figura 25 y 26 se presentan las dinámicas de temperatura de los procesos de refrigeración y aclimatación de muestras, en donde se evidencia la tendencia gradual que se presentó, lo cual nos permite afirmar que el manejo de temperatura de las muestras fue apropiado.

Figura 25. Dinámica de refrigeración de muestras



**Figura 26. Dinámica de aclimatación de muestras**



#### **6.4 PROTOCOLOS ESTABLECIDOS PARA EL MANEJO ADECUADO DEL MATERIAL SEMINAL**

Con respecto a la experiencia que se adquirió en el manejo adecuado del material seminal, se establecieron e implementaron tres protocolos, los cuales se listan a continuación.

##### **6.4.1 Protocolo de ingreso al laboratorio**

El ingreso de cualquier persona al laboratorio se debe hacer con un calzado diferente al utilizado en la granja, ropa y bata limpia.

AL ingresar al laboratorio el personal debe asear sus manos hasta la altura del codo con yodo.

NOTA: el área del laboratorio se debe mantener barrida y aseada permanentemente e incluye el lavado y desinfección del mesón, lavaplatos paredes y piso.

#### **6.4.2 Protocolo de manejo del verraco**

Realizar previo aseo del macho que será colectado.

Preparar con anterioridad el termo de colección (vaso de icopor con filtro fijado con liga de goma protegido con papel aluminio y tapa)

Dirigir el macho hacia el corral de toma de semen

Colocarse un guante de recolección y luego un guante plástico para realizar aseo al prepucio

Secar y evacuar el prepucio masajeando de atrás hacia delante

Permitir que el macho monte el potro

Al desenvainar el pene, se debe sujetar con ayuda de una servilleta estéril dejando libre el extremo para la salida libre del semen, sin que este toque la mano.

Colectar en el termo la fracción rica (eyaculado cremoso y lechoso).

Nunca se debe soltar el pene hasta terminar la salida de la última fracción.

Tapar el termo y llevarlo al laboratorio para su calificación inmediata.

Dirigir el macho al corral adecuadamente reduciendo al máximo el stress.

**NOTA:** El corral de monta y maniquí se debe asear antes y después de su uso.

#### **6.4.3 Protocolo de manejo y dilucion del semen**

Antes de la recepción del semen se debe acondicionar el laboratorio desinfectando el material y verificando el normal funcionamiento de equipos.

En un Erlenmeyer de 1000 ml verter el contenido de un sobre de diluyente asegurando que no contenga impurezas, agregar 500 cm<sup>3</sup> de agua destilada a 37°C, agitar hasta disolver totalmente el diluyente y obtener una solución de color transparente, adicionar 500 cm<sup>3</sup> de agua destilada y agitar nuevamente.

Colocar la solución en el baño maría a 37°C y reservar hasta la llegada del semen.

Una vez recibido el semen se debe realizar su valoración de calidad macroscópica (color, olor, volumen)

Realizar valoración de calidad microscópica (motilidad, tipo de movimiento, aglutinaciones y concentración espermática por conteo en la cámara de burker) para efectuar la dilución del semen en el menor tiempo posible.

Una vez estimada la concentración espermática realizar dilución del semen en el diluyente preparado con anterioridad asegurando que la temperatura de este sea la misma del semen.

Dosificar suavemente la dilución

Dejar durante dos horas las dosis para su aclimatación, evitando el contacto directo con la luz y el medio

llevar a refrigeración a 15°C, girando las dosis cada 6 horas manteniendo homogénea la dilución.

## 7. CONCLUSIONES

El uso de la inseminación artificial constituye una alternativa económica y práctica para incorporar el mejoramiento genético y para aprovechar los alcances que representa esta tecnología, es importante realizar la valoración de calidad espermática como pieza elemental en el manejo adecuado de la dilución del material seminal, logrando dosis inseminantes adecuadas con gran capacidad fecundante, para efectuar esta valoración de manera adecuada es indispensable realizar tanto la medición de variables macroscópicas como microscópicas.

Se dio respuesta al problema encontrado en la granja porcicola villa Alejandra, estableciéndose protocolos de manejo del verraco, de manejo y dilución del semen y uso adecuado del laboratorio, además se realizó un cronograma de uso y colección de los machos, resolviendo con la inclusión de estas prácticas el déficit de material seminal requerido para cubrir las necesidades reproductivas de la granja

El efecto que tiene el diluyente en la preservación de las características asociadas a la calidad seminal no tuvo diferencias significativas, por tanto es viable el uso de un diluyente de corta o larga conservación para su uso en periodos de hasta 60 horas de refrigeración.

La determinación de características de calidad para semen fresco encontradas corresponde a valoraciones de material seminal de buena calidad para su utilización en inseminación artificial, y están de acuerdo con lo reportado en la literatura en estudios de valoración de calidad seminal.

La inseminación artificial y directamente la utilización de diluyentes espermáticos permite conservar las características del eyaculado por periodos de tiempo prolongados, lo que permite un mayor aprovechamiento del material seminal colectado.

La valoración del semen diluido en diferentes intervalos de tiempo tras su dilución, evidencio el deterioro progresivo que se presenta en las características de calidad seminal, principalmente en la variable de motilidad, que como se ha ilustrado es una de las características más usadas en la estimación de fertilidad y que limita el uso de las muestras después de 60 horas de conservación.

La metodología que se adoptó para realizar la refrigeración y aclimatación de las muestras tuvo un excelente comportamiento presentando una dinámica de temperatura gradual, que aseguro un manejo adecuado del semen diluido reflejado en muestras de buena calidad con respuestas aceptables inclusive en la hora 60 de valoración.

La determinación de las variables evaluadas sugiere que si bien hasta las 60 horas se evidencia viabilidad espermática, el tiempo optimo de utilización del material colectado esta entre las 24 y 36 horas, periodo en el cual se aprovecha al máximo las bondades de los diluyentes usados en la preservación de las cualidades seminales; conclusión a la que se llega al observar el comportamiento de variables como motilidad y tipo de movimiento las cuales para este periodo de tiempo registran una perdida del porcentaje de motilidad hasta de un 25% y un tipo de movimiento aceptable, indicativo de un material de alta calidad para usarse en el proceso de inseminación artificial.

## 8. RECOMENDACIONES

La valoración de calidad espermática es imprescindible en el desarrollo de la técnica de inseminación artificial, por eso se recomienda capacitar al personal encargado del área de reproducción para que realicen el análisis macroscópico y microscópico previo a la dilución de los eyaculados.

La investigación no reportó diferencias significativas entre tratamientos, por tanto se recomienda el uso de diluyentes de corta y larga conservación para periodos de conservación de hasta 60 horas.

Basados en la experiencia que dejó esta investigación en lo referente a los valores de las variables asociadas a la calidad una vez estandarizado el método, se sugiere, acatar los protocolos de manera permanente, pues gracias a estos se realiza un adecuado manejo del macho, del eyaculado y de la dilución.

La obtención de dosis inseminantes de alta calidad, puede generar un mercado adicional en la explotación, ya que cuenta con reproductores de alta genética, por tanto se recomienda ofrecer este producto, aprovechando la referencia creada con este estudio

Se recomienda continuar investigando en el proceso de inseminación artificial, en temas como la determinación del tiempo óptimo para la inseminación, detección de celos, técnica de inseminación y manejo de hembras post inseminación, a fin de corregir falencias que se estén presentando en la explotación.

Dar a conocer que en el estudio realizado, se encontró que el material diluido en la misma granja es viable hasta por un periodo de 60 horas tras su dilución, para que puedan ser implementados en otras explotaciones según sean sus necesidades de dosis de inseminación

Se recomienda, elaborar un cronograma de uso y descargue de los machos reproductores de una explotación, permitiendo periodos de descanso suficientes que permitan la recuperación fisiológica del macho, para obtener valores de calidad adecuados que permitan avanzar en el mejoramiento genético que se plantee.

Se recomienda realizar la valoración de calidad seminal Test hiposmótico (HOST), ya que constituye en una metodología económica, de fácil realización, y que permite estimar el porcentaje de células inviables presentes en un eyaculado y según lo reportado en la literatura, tiene un gran índice de correlación con la fertilidad y el tamaño de las camadas.

## BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, J. Técnicas de contraste en la evaluación del semen porcino. En: Revista Computarizada de Producción Porcina. 2005. Vol. 12, no. 3, p.168-177.

ACOSTA, M. RUEDA, M. PERDIGON, R. Comparación de dos técnicas en la determinación de morfo anomalías del semen porcino. [On line]. 2007, vol. 25. [Citado el 13 de marzo de 2016], pp. 32-39. disponible en: [https://www.google.com.co/?gws\\_rd=ssl#q=ACOSTA%2C+M.+RUEDA%2C+M.+PERDIGON%2C+R.+Comparaci%C3%B3n+de+dos+t%C3%A9cnicas+en+la+determinaci%C3%B3n+de+morfo+anomal%C3%ADas+del+semen+porcino](https://www.google.com.co/?gws_rd=ssl#q=ACOSTA%2C+M.+RUEDA%2C+M.+PERDIGON%2C+R.+Comparaci%C3%B3n+de+dos+t%C3%A9cnicas+en+la+determinaci%C3%B3n+de+morfo+anomal%C3%ADas+del+semen+porcino).

ARIAS, T., CABALLERO, N., DIEGUEZ, F. J. Características del semen y calidad espermática de verracos. En: Revista Computarizada de Producción Porcina Instituto de Investigaciones Porcinas. 2001. Vol. 8, no. 1, p. 1-5.

BABOT, D. Gestión en empresas de producción porcina análisis, diagnóstico y toma de decisiones [en línea]. [Lleida, España]: Universidad de Lleida, 2001 [consultado el 04 de febrero de 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=6DH0TOLD94C&pg=PA75&lpg=PA75&dq=Cameron,+R.D.:Sexual+development+and+semen&source=bl&ots=IGttunQAjT&sig=cGP\\_2VR\\_nsdIqwCERegzOxQwo&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiPwdu4z9KAhWH9x4KHWkbA3QQ6AEIjAA#v=onepage&q=Cameron%2C%20R.D.A.%3ASexual%20development%20and%20semen&f=false](https://books.google.com.co/books?id=6DH0TOLD94C&pg=PA75&lpg=PA75&dq=Cameron,+R.D.:Sexual+development+and+semen&source=bl&ots=IGttunQAjT&sig=cGP_2VR_nsdIqwCERegzOxQwo&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiPwdu4z9KAhWH9x4KHWkbA3QQ6AEIjAA#v=onepage&q=Cameron%2C%20R.D.A.%3ASexual%20development%20and%20semen&f=false)

BONET, S., MARTINEZ, E., RODRIGUEZ, J. E., BARRERA, X. Biotecnología de la reproducción porcina: Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Girona.: Universidad de Girona, 2006. 303 p.

CABRERA, P. PANTOJA, C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. En: Rev Inv Vet. 2012. Vol. 23, no.2 p.192-200.

CARPIO C., M; CADILLO C., J y MELLISHO S., E. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. [online]. 2008, vol.19, no.1 [citado 2016-03-15], pp.15-19. Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S160991172008000100003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160991172008000100003&lng=es&nrm=iso)>.

DAZA, Argimiro. Manejo de la reproducción en el ganado porcino. Madrid.: Aedos Editorial, 1992. 384 p.

DIAZ FRANCO, Orlando et al. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplásmicas persistentes. [online]. 2009, vol.19, no.5 [citado 2016-03-15], pp. 500-505. Disponible en: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000500010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000500010&lng=es&nrm=iso)>

DIAZ, O. MESA, H. GOMEZ G, HENAO, F, J. Evaluación in vitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. [En línea] 2008, vol. 3, no. 1. [Citado el 13 de marzo de 2016], pp. 32-37. disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Orlando\\_Diaz\\_Franco/publication/255908765\\_Evaluacin\\_in\\_vitro\\_de\\_la\\_viabilidad\\_del\\_semen\\_porcino\\_hasta\\_120\\_h\\_de\\_almacenamiento\\_en\\_refrigeracin/links/00b7d520d670887034000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Orlando_Diaz_Franco/publication/255908765_Evaluacin_in_vitro_de_la_viabilidad_del_semen_porcino_hasta_120_h_de_almacenamiento_en_refrigeracin/links/00b7d520d670887034000000.pdf)

FLOWERS, W. Semen quality assurance [en línea]. En: Anual North Carolina pork conference, (49: 16-17, febrero: Greenville, Carolina del Sur). Semen quality assurance. Raleigh, Department of Animal Science North Carolina State University. 2005, [consultado el 13 de marzo de 2015]. Disponible en: ([http://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/ncporkconf/2005/sessions/flowers.htm](http://www.ncsu.edu/project/swine_extension/ncporkconf/2005/sessions/flowers.htm)).

GADEA, et al. Cooling and Freezing of Boar Spermatozoa: Supplementation of the Freezing Media With Reduced Glutathione Preserves Sperm Function. En: Journal of Andrology. Mayo a junio, 2005, vol. 26 no.3,. p. 396–404.

GADEA, J. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. En: Spanish Journal of Agricultural Research. 2003. Vol. 1, no. 2, p.17-27.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. En: Theriogenology. Junio, 2005. Vol. 15, no .63, p. 431-444.

HENAO RESTREPO, Guillermo et al. Efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical. [en línea]. 2004,

vol.57, no.2 [citado el 2016-03-04], pp. 2355-2372. Disponible en: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S03042847200400020001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03042847200400020001&lng=en&nrm=iso)>.

HERNANDEZ, P.J.E.; FERNANDEZ, R.F y MEJIA, R.A.I. Efecto de la monta natural y el uso de diferentes tipos de semen sobre la productividad de la cerda. [online]. En: Rev Salud Anim. 2008, vol. 30, no.2 [citado 2016-03-06], pp. 98-102. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253570X2008000200005&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2008000200005&lng=es&nrm=iso)>.

HERRERA GALINDO, Volvamos al campo: Inseminación en porcinos. Bogotá, Colombia.: Grupo Latino, 2003. 27 p.

MADELYN RUEDA, R. PERDIGÓN, TERESA ARIAS, D. MENDOZA, J.A. BENÍTEZ , C. LEMUSY M. TOSAR. Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubano DICIP. [en línea], En: Revista computarizada de producción porcina. 2009, Vol.16, no. 1 [citado el 13 marzo 2016], pp. 26-30. disponible en [http://www.iip.co.cu/R CPP/201/201\\_06MJAcosta.pdf](http://www.iip.co.cu/R CPP/201/201_06MJAcosta.pdf)

MAGAPOR S. L., Ficha tecnica VitasemLD. [en línea] Magapor S.l . Saragoza, España: Magapor, 2003 [fecha de consulta: 05 de mayo de 2016] Disponible en: [http://www.magapor.com/images/PDFs/Products/EXTENDERS/SP\\_VITASEM\\_ago\\_2013.pdf](http://www.magapor.com/images/PDFs/Products/EXTENDERS/SP_VITASEM_ago_2013.pdf)

MEJIA, A. Efecto de la concentración espermática de semen Porcino sobre sus características post - descongelamiento. Trabajo de grado Maestría en biotecnología. Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2010. 36 p.

MINITUBE. Ficha tecnica MIII. [en línea]. Minitube Internacional. Germany: Minitube. 2013,. [fecha de consulta:05 de mayo de 2016] Disponible en: [http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13515-0083\\_Leaflet-MIII\\_es\\_131127.pdf](http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13515-0083_Leaflet-MIII_es_131127.pdf)

OLIVARES MUÑOZ, A. Parámetros reproductivos en cerdas inseminadas con semen refrigerado en presencia de plasma seminal homologo. Trabajo de grado

Médico Veterinario Zootecnista. Veracruz.: Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2012. 33 p.

RUGELES-PINTO, C, CAICEDO-TORO, R, VERGARA-GARAY, O, LINARES-ARIAS, J, ALMENTERO-SUÁREZ, C, Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. [en línea] En: Revista Científica XXIII, 2013, vol. 23, no. 3. [Fecha de consulta: 4 de marzo de 2016], pp. 206-210 Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95926665007>>

SANCHEZ, A., RUBILAR, J., GATICA, R. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. En: Arch. med. vet. 2002. vol. 34, no.1, p. 131-134.

TURBA, M. FANTINATI, P. BERNARDINI, C. GENTILINI, F. BACCI, M. FORMI, M. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. [En línea]. [Bologna, Italia]: Animal Reproduction Science, Mayo de 2007, [citado el 15 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713139>