



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES

TESIS

Que para obtener el grado profesional de Maestro en Producción Agropecuaria
opción terminal área pecuaria

CALIDAD DEL SEMEN A 5 °C Y SU EFECTO EN LA FERTILIDAD Y TAMAÑO DE CAMADA DE CERDAS EN EL TRÓPICO DE GUERRERO MÉXICO

Presenta

MVZ. KEYLA MADAHÍ SÁNCHEZ JAIMES

ASESOR: DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO

COASESOR: DR. EFRÉN ESTRADA PAQUI

COMITÉ TUTORIAL:

DR. AURELIANO JUÁREZ CARATACHEA

DR. BENJAMÍN GÓMEZ RAMOS

MC. NAYDA LUZ BRAVO HERNÁNDEZ

MORELIA MICHOACÁN, MARZO 2019.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la calidad seminal al enfriamiento de 5 °C y su efecto en la fertilidad y tamaño de camada de cerdas multíparas inseminadas en el trópico de Guerrero, México. El primer periodo de estudio se realizó en el centro de transferencia genética y laboratorio de reproducción porcina de la FMVZ1– UAGRO. Se utilizaron 60 eyaculados provenientes de cuatro verracos de línea comercial Pietrain/Duroc/Yorkshire sexualmente maduros, se colectó la fracción rica del eyaculado y diluida *in situ* 1:1 en el extensor comercial MIII®. Previamente los eyaculados fueron evaluados para tener referencia de la calidad seminal. Posteriormente, el semen diluido se conservó por 24 h a 17 °C. Se centrifugó a 2400 rpm x 5 minutos se descartó el sobrenadante y se adicionó el medio de enfriamiento a base de lactosa 248 mM, Kanamicina 0.8 g/L y yema de huevo deshidratada 20% por 120 minutos hasta alcanzar 5 °C (la tasa de enfriamiento de 0.11 °C x minuto). Se determinaron dos evaluaciones seminales la primera cuando el semen alcanzó los 5 °C (0 h) y la segunda evaluación a las 24 h de conservación. Las variables de calidad del semen fueron motilidad general, viabilidad espermática, tolerancia osmótica y la integridad acrosomal. El segundo periodo de estudio se realizó en granja comercial sitio 1 en la región centro del estado de Guerrero. Se utilizaron cerdas multíparas al destete (22 días) de línea comercial Yorkshire/Landrace con condición corporal de 3 (en una escala de 1-5). Se formaron 2 grupos de cerdas al azar: grupo 1 se tomaron los registros de 42 cerdas inseminadas con semen diluido a 17 °C (Control de granja) y el grupo 2 se inseminó a 42 cerdas con semen a 5 °C. En ambos grupos se utilizó la técnica de IA post-cervical con 3000×10^6 espermatozoides viables en 60 mL del medio comercial MIII®. La detección del estro fue en presencia de verraco recelador y el reflejo de inmovilidad de la cerda. Se procedió a realizar la primera inseminación a las 24 horas y la segunda 12 horas posteriores a la primera inseminación. La fertilidad se determinó mediante la observación de no retorno a estro a los 21 días post-inseminación y la confirmación de gestación mediante ultrasonografía abdominal a los 42 días. La valoración de la prolificidad al parto se llevó mediante el registro del tamaño de camada al nacimiento (lechones nacidos totales,

lechones nacidos vivos y lechones nacidos muertos). Los resultados de la calidad seminal a 0 y 24 h, así como los de prolificidad de las cerdas considerando la temperatura de conservación del semen (17 °C y 5 °C), se sometieron al análisis de varianza mediante la prueba de T de student, para la diferencia de medias y la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. Los datos de fertilidad se evaluaron mediante la prueba de χ^2 de Pearson. El valor de significancia fue $P < 0.05$. La motilidad general, integridad acrosomal y tolerancia osmótica no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) a 5 °C ya sea a la hora 0 y 24 horas, mientras la viabilidad espermática fue mejor a la hora 24 de evaluación ($P < 0.05$). La fertilidad entre las cerdas multíparas inseminadas con semen a 5 °C representó el 85.71 % comparado con 80.95 % con semen a 17 °C sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos grupos. La prolificidad entre los grupos no mostraron diferencia significativa ($P > 0.05$) en las variables de lechones nacidos totales (10.98 ± 0.42 y 11.94 ± 0.44) y lechones nacidos vivos (10.48 ± 0.40 y 11.42 ± 0.48) con semen a 17 °C y a 5 °C respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos, el uso de semen a 5 °C es una alternativa que por sí sola o conjuntamente con la aplicación de semen a 17 °C puede ser utilizada en los programas reproductivos de granjas porcinas comerciales en condiciones de trópico.

Palabras clave: calidad seminal a 5 °C, IA, Fertilidad, tamaño de camada, verracos.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the seminal quality at 5°C cooling and its effect on the fertility and litter size of multiparous sows inseminated in the tropic of Guerrero. The first study period was carried at the genetic transfer center and swine reproduction laboratory of FMVZ1-UAGRO. Sixty ejaculates from 4 sexually mature Pietrain / Duroc / Yorkshire commercial line boars were used, the rich fraction of the ejaculate was collected and diluted *in situ* 1: 1 in the commercial extender Mill®. Previously the ejaculates were evaluated to have reference of the seminal quality. Subsequently, the diluted semen was stored for 24 hours at 17°C, Centrifuged at 2400 rpm for 5 minutes, the supernatant was discarded and the cooling medium based on lactose 248 mM, Kanamycin 0.8 g / L and egg yolk 20% for 120 minutes until reaching 5°C (the cooling rate of 0.11°C/minute). Two seminal evaluations were determined, the first when the semen reached 5°C (0 h) and the second evaluation after 24 h of storage. Semen quality variables were total motility, sperm viability, osmotic tolerance and acrosomal integrity. The second study period was carried in commercial farm site 1 in the central region of the state of Guerrero. Weaning multiparous sows (22 days) of Yorkshire / Landrace commercial line, with body condition of 3 (on a scale of 1-5) were used. Two groups of random sows were formed: group 1 records were from 42 sows inseminated with semen diluted at 17 °C (farm control) and group 2 was inseminated to 42 sows with semen at 5 °C. In both groups the post-cervical AI technique was used with 3000×10^6 viable sperm in 60 mL of the commercial medium Mill®. The detection of estrus was in the presence of boar and the reflection of immobility of the sow. the first insemination was performed at 24 h and the second 12 h later. Fertility was determined by observation of non-return to estrus 21 days post-insemination and pregnancy confirmation by abdominal ultrasonography at 42 days. The assessment of prolificacy at birth the litter size (total born piglets, live born piglets and stillborn piglets). The results of the seminal quality at hour 0 and hour 24 as well as the prolificacy of the sows considering the storage temperature of the semen (17 °C and 5 °C), were subjected to the analysis of variance by means of the T test for the difference of means and Levene's test for

equality of variances. The fertility data were evaluated by the Pearson X^2 test. The significance value was $P < 0.05$. Motility, acrosomal integrity and osmotic tolerance did not show significant differences ($P > 0.05$) at 5 °C either at hour 0 and 24 hours, while sperm viability was better at the 24 h of evaluation ($P < 0.05$). Fertility among multiparous sows inseminated with semen at 5 °C represented 85.71%, compared to 80.95% with semen at 17°C without significant differences ($P > 0.05$) between both groups. The prolificacy between the groups did not show significant difference ($P > 0.05$), in the variables of total born piglets (10.98 ± 0.42 and 11.94 ± 0.44) and live born piglets (10.48 ± 0.40 and 11.42 ± 0.48) with semen at 17 °C and at 5 °C respectively. According to the results obtained, the use of semen at 5 °C is an alternative that alone or together with the application of semen at 17 °C that can be used in the reproductive programs of commercial swine farms in tropical conditions.

Key words: seminal quality at 5 °C, IA, Fertility, litter size, jabalíes.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	11
II.	JUSTIFICACIÓN	13
III.	REVISIÓN DE LITERATURA	15
3.	Aspectos reproductivos del verraco	15
3.1	Anatomía y fisiología del aparato reproductor del verraco	15
3.1.1	Testículos	15
3.1.2	Epidídimo	16
3.1.3	Conductos deferentes	16
3.1.4	Uretra	16
3.1.5	Pene	16
3.1.6	Glándulas sexuales accesorias	17
3.2.	Funcionalidad del espermatozoide	18
3.3	Factores que afectan la calidad seminal de verracos	20
3.3.1.	Raza o línea genética	21
3.3.2	Edad y frecuencia de colección del verraco	21
3.3.3.	Efecto nutricional	22
3.3.4.	Efecto del medio ambiente	23
3.4.	Métodos de colección de semen	24
3.4.1.	Vagina artificial	24
3.4.2.	Electroeyaculador	25
3.4.3.	Técnica de la mano enguantada	25
3.5.	Evaluación seminal en el verraco	26
3.5.1.	Motilidad general	26
3.5.2.	Viabilidad espermática	27
3.5.3.	Morfología	29
3.5.4.	Concentración espermática	29
3.5.5.	Evaluación tolerancia osmótica	30
4.	Conservación seminal	31
4.1	Semen fresco-diluido almacenado a 17°C	31

4.2 Semen encapsulado y almacenado a 15 °C	33
4.3 Semen criopreservado	34
4.4 Semen refrigerado a 5° C	35
5 Aspectos reproductivos de la cerda	39
5.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la cerda	39
5.1.1 Ovarios	39
5.1.2 Oviductos (infundíbulo ampolla e istmo)	40
5.1.3 Útero (cuernos, cuerpo y cérvix)	40
5.1.4 Vagina y vulva	41
5.2 Técnicas de inseminación artificial en cerdas	42
5.2.1 Inseminación cervical o convencional (IAC)	43
5.2.2 Inseminación post-cervical (IAPC)	44
5.2.3 Inseminación quirúrgica o intrauterina profunda (IAQ-DUI)	45
IV HIPÓTESIS	47
V. OBJETIVOS	47
5.1 General	47
5.2 Específicos	47
VI. MATERIALY MÉTODOS	48
6.1 Área de estudio	48
6.2 Diseño experimental	49
6.2.1 Colección de semen	49
6.2.2 Analítica seminal	49
6.2.3 Procesamiento del semen a 5 °C	50
6.2.4 Parámetros evaluados del semen a 5 °C	50
6.2.4.1 Motilidad general	50
6.2.4.2 Viabilidad espermática	50
6.2.4.3 Ensayo dual de resistencia osmótica (HOST) / integridad acrosomal (Azul de comassie)	51
6.3 Segundo periodo de estudio: Evaluación de la fertilidad y prolificidad	51

6.4. Análisis estadístico	53
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	54
VIII. CONCLUSIONES	60
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
X. ANEXOS FOTOGRÁFICOS	76

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de referencia del semen de verracos en condiciones de trópico de Guerrero, México (n=60).	50
Cuadro 2. Evaluación de la calidad espermática a 5° C del .semen de verraco (media y error estándar n=60).	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del testículo del verraco.	15
Figura 2. Localización anatómica de las vesículas seminales en el verraco.	17
Figura 3. Estructura del espermatozoide de verraco.	18
Figura 4. Regiones acrosomales del espermatozoide porcino.	19
Figura 5. Vagina artificial para cerdos.	25
Figura 6. Electroeyaculador.	26
Figura 7. Colección seminal mediante la técnica de mano enguantada.	26
Figura 8. Tinción de Eosina-nigrosina en la evaluación de viabilidad espermática.	28
Figura 9. Anormalidades presentes en espermatozoide de verraco.	30
Figura10. Evaluación de la concentración espermática.	30
Figura 11. Prueba HOST/Azul de comassie.	31
Figura 12. Cámara de almacenamiento a temperaturas de 15 °C y 17 °C.	33
Figura 13. Semen de verraco encapsulado.	34
Figura 14. Criopreservación de semen de verraco.	35
Figura 15. Semen de verraco enfriado a 5 °C.	38
Figura 16. Anatomía del aparato reproductor de la cerda.	40
Figura 17. Localización de los cuernos en la cerda.	41
Figura 18. Inseminación cervical (IAC).	44

Figura 19. Inseminación post-cervical (IAPC).	45
Figura 20. Inseminación no quirúrgica (DUI).	47
Figura 21. Localización del área de estudio; evaluación de calidad seminal.	49
Figura 22. Traslado del semen enfriado a 5 °C hasta la granja de inseminación.	49
Figura 23. Grupo de cerdas utilizadas en la IAPC con semen enfriado a 5 °C.	53
Figura 24. Procesamiento de semen a 5 °C	76
Figura 25. Protocolo de IAPC, con semen a 5 °C	76
Figura 26. Viabilidad espermática del semen a 5 °C	77
Figura 27. Lechones nacidos, IAPC; semen a 5 °C	77
Figura 28. Lechones al día 15, AIPC; semen a 5 °C	77
Figura 29. Lechones destetados, IAPC; semen a 5 °C	77
Figura 30. Lote 1 de lechones destetados, IAPC; semen a 5 °C	77

Índice de gráficas

Gráfica 1. Fertilidad de cerdas multíparas inseminadas con semen a 17 °C y 5 °C mediante la técnica post-cervical en el trópico de Guerrero, México (n=84).	58
Gráfica 2. Tamaño de camada de cerdas multíparas inseminadas con semen a 17 °C y a 5 °C en condiciones de trópico de Guerrero, México (Media y error estándar, n=78).	59

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la producción porcina es la actividad más dinámica y va a la vanguardia en lo que respecta a la nutrición, manejo, sanidad y sobre todo en biotecnología reproductiva, mostrando en los últimos años un crecimiento de 3% (Martínez-Castañeda y Perea-Peña, 2012; Bobadilla *et al.*, 2013). En México, de acuerdo a datos oficiales del INEGI (2008), se tienen funcionando en el país aproximadamente dos millones de granjas de cerdos con poblaciones de menos de 20 cabezas, lo que representa cerca de la mitad de la población porcina del país (Martínez-Castañeda *et al.*, 2012). En este sentido, las granjas tecnificadas ocupan el 30% del inventario nacional y producen cerca del 50% del total de la carne, las granjas semi-tecnificadas poseen cerca del 25 y 30% del inventario nacional con una producción del 20 y 30% de la carne que se consume en el país, el manejo de reproductores juega un rol clave dentro de la producción, ya que la función reproductiva del verraco se puede ver comprometida y ocasionar alteraciones en la hembra, que repercutirán a corto plazo en problemas de infertilidad (como disminución en la tasa de partos y número de camada) afectando la estabilidad económica de las unidades de producción, las cuales dependen de la producción de lechones (Cuevas *et al.*, 2005; Martínez-Castañeda y Perea-Peña, 2012). Diferentes factores producen variaciones directas en el verraco, repercutiendo en la calidad de los eyaculados, de mayor importancia es el efecto que la temperatura ambiental ejerce sobre las características espermáticas, aumentando considerablemente las anomalías morfológicas y funcionales del espermatozoide, así mismo el volumen y la motilidad (Henaó *et al.*, 2004; Hernández y Alemán, 2008). Sin embargo, desde el punto de vista productivo, se estima que el costo de mantener un verraco, en un esquema primer parto-eliminación representa una limitante para la producción a mediana escala (Díaz *et al.*, 2009). Una alternativa a esta situación es la Inseminación Artificial (IA), que proporciona beneficios de mejoramiento genético de hasta un 50% en una generación y desde el punto de vista productivo, al utilizar esta técnica en las unidades productivas los costos en alimentación, higiene, sanidad e instalaciones

se ven reducidos (Quintero *et al.*, 2017). Se estima que actualmente se realizan 19 millones de IA en cerdos de todo el mundo, del cual el 98% se realiza con semen diluido a 15° C y 18° C almacenado en cámaras de conservación y solo un 2% utiliza semen congelado-descongelado, algunas publicaciones previas han dejado de manifiesto que si la IA se realiza adecuadamente, el desempeño reproductivo de las cerdas puede ser igual o mayor que el alcanzado con la monta natural de un verraco (Perdigón *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2008; Quintero *et al.*, 2017; Quiroz-Rojas *et al.*, 2018). Si bien la IA ha sido la herramienta más importante que permitió el avance en la producción porcina, el grado de utilización en los diversos países del mundo es muy variable, debido a que el espermatozoide porcino, tiene particularidades que lo hacen muy sensible a los cambios de temperatura y el almacenamiento por periodos prolongados, estos inconvenientes han impulsado la investigación científica en el desarrollo de métodos de conservación sin embargo, cada método posee desventajas que los hace vulnerable para su uso en los diferentes sistemas de producción (Batista *et al.*, 2007; Bailey *et al.*, 2008; Quintero *et al.*, 2017).

II. JUSTIFICACIÓN

En América Latina la porcicultura es una actividad dinámica, que contribuye con la generación de empleo, capital monetario y alimento, conlleva en su proceso un carácter cultural, social y económico, lo que le ha permitido a lo largo del tiempo evolucionar dentro del ámbito pecuario. En México esta actividad posee diferentes sistemas de producción, todos enfocados a la generación de diversos productos que satisfacen la demanda del consumidor, en este sentido se estima que la porcicultura contribuye con la economía al generar más de 3500 empleos directos e indirectos al año, incluyendo desde las empresas transnacionales hasta los pequeños productores familiares. De los diferentes sistemas de producción porcina en el país, sin duda la producción en el trópico representa una desventaja para los poricultores, principalmente por el efecto de las altas temperaturas sobre la función reproductiva de los cerdos, repercutiendo en problemas de subfertilidad del macho y su derivado en la fertilidad de la hembra. Sin embargo estas limitantes han involucrado el desarrollo de innovaciones biotecnológicas y genéticas para hacer rentable la producción, lo que ha traído consigo la aplicación de medidas tecnológicas específicas que solucionen estas limitantes; principalmente el uso de la Inseminación Artificial (IA), ha logrado un mayor avance genético, la reducción del número de reproductores aunado a una disminución significativa de enfermedades y mayormente la disminución en los costos de producción. Para el desarrollo de la IA es necesario conservar los espermatozoides durante periodos prolongados, hasta su aplicación, por lo anterior es necesario reducir la actividad metabólica de los espermatozoides mediante la dilución del semen y el descenso de la temperatura, actualmente existen 4 métodos de conservación seminal en cerdos: a) El semen fresco diluido almacenado a 17 °C que ofrece hasta 85% de fertilidad comparado con la monta natural de 77.5%; sin embargo, para su transporte y aplicación en distancias lejanas representa un inconveniente debido principalmente al manejo especial que se debe tener, condicionalmente debe ser transportado en una cámara de conservación especial, debido a que los cambios de temperatura y la exposición a

la luz dañan el semen, en este sentido los costos en infraestructura dentro de la granja aumentan, b) El semen encapsulado que es mantenido a temperaturas de 15 °C ofrece resultados similares comparado con el método tradicional, pero su uso se limita para pruebas in vitro, c) semen criopreservado, supera las limitantes del tiempo de conservación del semen fresco tradicional, es ampliamente utilizado en granjas núcleo, donde la calidad genética es prioridad, aunado a ello posee baja supervivencia espermática (30-40%) y fertilidad reducida, con ello el costo representa una desventaja para su uso en campo, d) semen a 5 °C, este método utiliza aditivos protectores (yema de huevo o leche) que disminuyen el daño celular que ocasionan las temperaturas inferiores a 15 °C, es más conveniente para uso en campo y distancias lejanas sin la utilización de cámaras con temperatura controlada o nitrógeno líquido, sin embargo el semen de cerdo posee características que lo hacen muy sensible a los cambios de temperatura, puede ser motivo principal del poco uso en la IA del semen a 5 °C. Es importante generar alternativas viables para la porcicultura que ayuden a minimizar las limitantes dentro de la reproducción y que a su vez brinden seguridad en la producción y la provisión de recursos al poricultor. Poco se ha estudiado este método de conservación de semen a 5 °C y su utilización en la inseminación de cerdas, ante esto, la importancia de realizar la presente investigación, que comprende el estudio de la analítica seminal como viabilidad, motilidad general y resistencia osmótica del semen a 5 °C, así mismo como determinar su efecto en la fertilidad y prolificidad de cerdas en el trópico de Guerrero, México.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3. ASPECTOS REPRODUCTIVOS DEL VERRACO

3.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del verraco

El aparato reproductor del verraco, tiene entre sus funciones la formación, maduración, transporte y transmisión de las células germinales masculinas; los espermatozoides. El aparato reproductor del macho consta de testículos, epidídimo, conductos deferentes, uretra, pene y glándulas sexuales accesorias.

3.1.1 Testículos

En el verraco los testículos (**Fig. 1**) se encuentran en la región retroperitoneal, son de forma ovalada, con un contorno de tipo elíptico y miden aproximadamente 13 cm de largo y 7 cm de diámetro, su peso oscila de 300 a 350 gramos, son considerados los órganos sexuales primarios con función exocrina (producción celular de espermatozoides) y endocrina (producción de las células de Leyding y de Sertoli), están recubiertos por la túnica albugínea que se continúa en el interior del parénquima testicular formando los septos testiculares cuya función es dividir al parénquima en lobulillos, a continuación se encuentran los lóbulos o túbulos seminíferos cuya

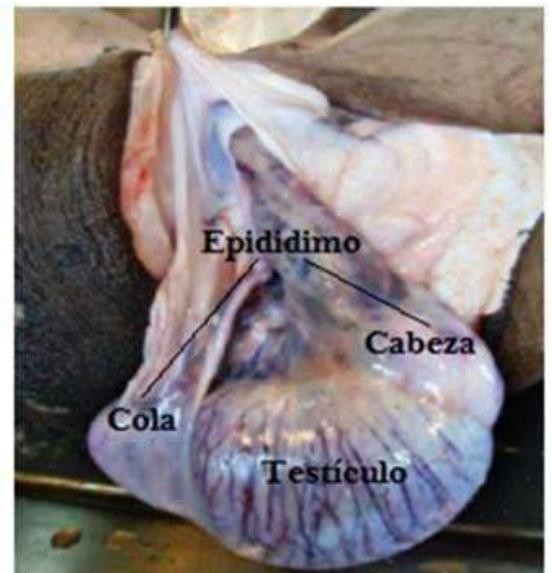


Figura 1. Anatomía del testículo del verraco

función primordial es producir espermatozoides a partir de las espermatogonias (espermatogénesis), a la vez estos túbulos seminíferos se encuentran sostenidos por las células de Sertoli, las cuales tienen las funciones de nutrir a las células, fagocitar gotas citoplasmáticas, ayudar en la liberación de los espermatozoides hacia la luz tubular (espermiación) y producir estrógenos, así mismo en el intersticio de los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig, cuya función es producir andrógenos como la testosterona, (Hafez, 2006; Williams, 2013; Estrada-Paqui, 2017; Trujillo, 2017).

3.1.2 Epidídimo

Adyacente a cada testículo se encuentra el epidídimo, mide aproximadamente 18 cm de largo y puede pesar alrededor de 85 gramos (**Fig. 1**), consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola, tiene una doble función, ya que en la cabeza y el cuerpo se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, mientras que en la cola se reabsorben y fagocitan las gotas citoplasmáticas de los espermatozoides hasta que son expulsados, el ciclo maduración epididimaria del espermatozoide es aproximadamente de 14 días (Williams, 2013; Estrada-Paqui, 2017; Trujillo, 2017).

3.1.3 Conductos deferentes

Es la porción que se localiza después de la cola del epidídimo y su función principal es transportar a los espermatozoides hacia la uretra, la pared de este conducto deferente tiene tres estratos musculares o membranas: externa o fibrosa, media, e interna o mucosa. Este conducto es flexuoso en su porción testicular y está íntimamente unido a la túnica vaginal (Galina, 2009; Trujillo, 2017).

3.1.4 Uretra

Es un conducto cutáneo-musculoso cuya función es transportar tanto la orina como el semen, consta de tres partes o porciones: la porción pelviana, la porción vulvar (raíz del pene) y la porción peneana. La porción pelviana es muy larga y está cubierta por el músculo uretral grueso, excepto dorsalmente donde existe una capa fibrosa densa (Estrada-Paqui, 2017).

3.1.5 Pene

En el verraco, el pene mide entre 45 y 50 centímetros, con un diámetro de 1.5 a 2 centímetros, la parte terminal o glande tiene la peculiaridad de poseer forma de tirabuzón, lo que le permite adaptarse al cérvix de la cerda al momento de la copula, el tejido eréctil es escaso, por lo que está clasificado como fibroelástico, de ahí que se requiera poca cantidad de sangre para lograr la erección en el verraco, en la porción paraescrotal se forma una flexura sigmoidea, la cual es un doblez del pene que se forma gracias a los músculos retractores, estos se contraen en

estado de flacidez retrayendo al pene y se relajan durante la erección permitiendo desenvainar el pene (Galina, 2009; Trujillo, 2017).

3.1.6 Glándulas sexuales accesorias

Estas glándulas aportan la porción líquida al semen, este se compone de sustancias nutritivas que ayudan a mantener la viabilidad de los espermatozoides, estas glándulas son: próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales o de Cowper (**Fig. 2**), están ubicadas en la cavidad abdominal, específicamente en la porción pélvica de la uretra. La próstata consta de dos partes: el cuerpo y la porción

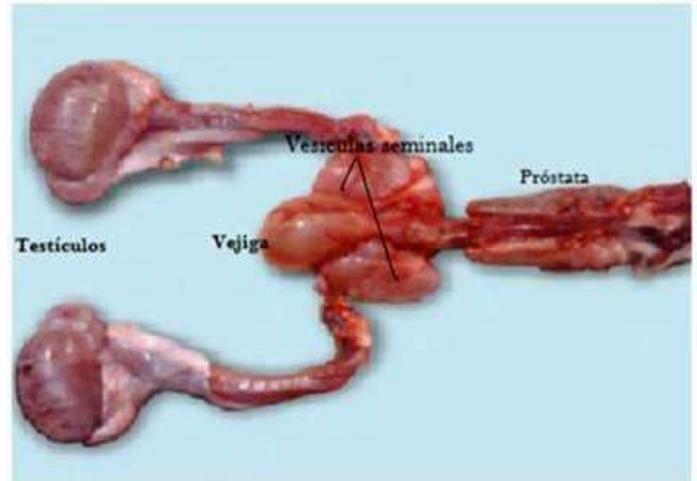


Figura 2. Localización anatómica de las vesículas seminales en el verraco

diseminada, su secreción contiene ácido cítrico, ácido ascórbico, proteínas, lípidos y azúcares, además constituye hasta el 60% del volumen total del eyaculado. Las vesículas seminales tienen una forma triangular y son muy voluminosas, pueden pesar hasta 210 gramos, tienen una longitud de 13 cm, un ancho de 7 cm y un grosor de 4 cm aproximadamente sirven como depósito y además secretan material mucoso rico en fructuosa y otras sustancias nutritivas, y prostaglandinas. Esta glándula contribuye fundamentalmente a dar volumen (10 a 30%) y material energético al eyaculado total. Las glándulas bulbouretrales, tienen forma cilíndrica, están ubicadas a lo largo de la uretra en su porción pélvica, la secreción de estas glándulas es gelatinosa (tapioca) y constituye parte última del eyaculado (Galina, 2009; Trujillo *et al.*, 2017).

3.2. Funcionalidad del espermatozoide

El espermatozoide de verraco es una célula dinámica altamente especializada, que aún después de la espermatogénesis continua con una serie de remodelaciones y adaptaciones inducidas por la interacción con su entorno, en el verraco el espermatozoide tiene una longitud total de 44-50 μm , dividido en tres secciones principales (**Fig. 3**): cabeza ($7\mu\text{m}$), cuello ($0.7\mu\text{m}$) y cola ($40\mu\text{m}$), adquiere sus principales características durante la espermatogénesis, el cual inicia divisiones mitóticas de las espermatogonias y la descripción de la ultra estructura, morfología y función de cada una de las estructuras que conforman al espermatozoide (Williams, 2013).

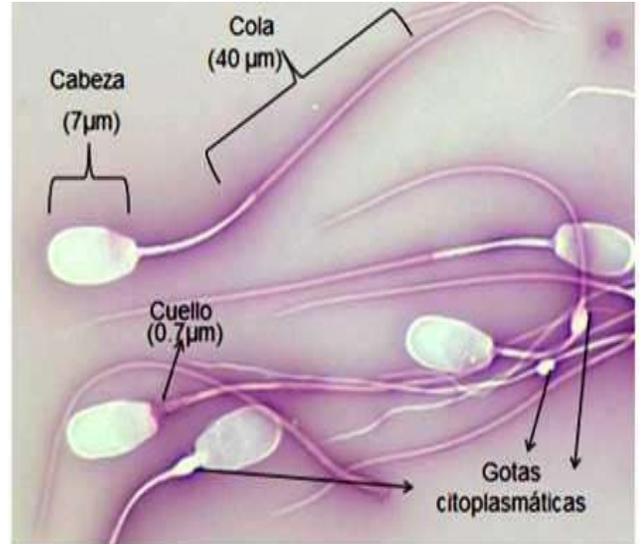


Figura 3. Estructura del espermatozoide de verraco

La cabeza espermática es una estructura de apariencia piriforme, de tipo espatulado y con forma oval, sus dos caras presentan características asimétricas, una aparentemente llana y la otra presenta una protuberancia apical en forma semilunar de $0.4\mu\text{m}$ de ancho que se extiende por los márgenes de la cabeza a lo largo de $1.2\mu\text{m}$, a su vez se subdivide en base a las características de la membrana (**Fig. 4**), por lo que se habla de la región acrosomal (área cubierta por el acrosoma), la región ecuatorial (área donde se inserta el acrosoma) y el área post-acrosomal (zona que solo presenta membrana plasmática) (Hafez, 2006; Galina, 2009; Williams, 2013). Dentro de la cabeza se encuentra el núcleo espermático como una estructura rígida formada por la teca peri nuclear, con longitud de $6.6\mu\text{m}$. La región acrosomal el grosor es de 220nm y en la región post-acrosomal es aproximadamente de 320nm , esta estructura contiene los filamentos de DNA que se estructuran en complejos núcleo proteínicos al ligarse a protaminas y a histonas, formando la cromatina condensada, el núcleo está envuelto por la teca peri nuclear, la cual es una estructura citoesquelética, que le brinda protección frente a los agentes externos potencialmente dañinos, como las proteasas, ADN-asas, detergentes y especies

reactivas de oxígeno (Estrada-Paqui, 2017; Trujillo *et al.*, 2017). Enseguida se localiza el acrosoma, como vesícula que cubre aproximadamente los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoide, en su interior contiene una gran variedad de enzimas proteolíticas (hidrolasas y esterasas), además contiene múltiples glucoproteínas que se condensan para formar la vesícula acrosómica así como distintas proteasas (proacrosina/acrosina, hialuridasas, glicohidrolasas y esterasas), en especial la hialuronidasa tiene la función de romper los puentes de ácido hialurónico que las células del cúmulo ha establecido entre sí, permitiendo la penetración del espermatozoide a través de la corona radiada hasta la zona pelucida del ovocito, esta liberación de estas enzimas se da cuando la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática en un proceso que se conoce reacción acrosomal (Estrada-Paqui, 2017; Trujillo *et al.*, 2017). El cuello del espermatozoide es un segmento de unión corto de 1 μm , se localiza entre el flagelo y la cabeza espermática, va desde la base del núcleo hasta la primera mitocondria de la pieza intermedia, dentro se pueden distinguir las siguientes estructuras: la placa basal, los cuerpos laminares, el capitulum y las columnas segmentadas, estas estructuras citoesqueléticas le permiten a la cabeza unirse al flagelo, también esta porción contiene las estructura para el movimiento del flagelo a la cabeza y posee el centriolo a partir del cual, se lleva cabo la primera división mitótica tras la fecundación del ovocito (Williams, 2013; Trujillo *et al.*, 2017). Por último el flagelo; es la estructura más larga del espermatozoide, contiene al axonema que está rodeado por unas fibras densas que son estructuras citoesqueléticas, tiene la función de proporcionar movimiento al espermatozoide, debido a la energía liberada de la hidrólisis del ATP y las mitocondrias ubicadas en él mismo. En las pruebas de funcionalidad de membranas por osmoresistencia, ésta estructura tiende a enrollarse, debido a que la membrana presente en esta región busca equilibrar el



Figura 4. Regiones acrosomales del espermatozoide porcino

contenido de los solutos intracelulares y extracelulares, corroborando a la prueba ser una membrana selectiva y funcional (Williams, 2013; Estrada-Paqui, 2017; Trujillo *et al.*, 2017).

La membrana plasmática es una estructura que rodea la cabeza espermática y también recubre a todo el flagelo, se organiza a manera de mosaico fluido que contiene diversas proteínas mezcladas en una matriz de fosfolípidos, estos mismos se distribuyen en dos monocapas contrarias, con la parte hidrofóbica en contacto formando una bicapa lipídica y brindándole asimetría a la membrana, la diferencia entre ambas monocapas favorece su polaridad y movimiento de translocación fosfolipídica; el espermatozoide del cerdo, tiene en su membrana plasmática el 60 a 70% de fosfolípidos, de los cuales 50% son lípidos esteres y posee una mayor concentración proteica y menor concentración de colesterol, el cual brinda estabilidad a la membrana y cierta rigidez, este decremento del colesterol es el cambio lipídico más conocido, está demostrado que el contenido de colesterol disminuye durante el tránsito del espermatozoide en el epidídimo, afectando la fluidez, la estabilidad ante el choque térmico y la reacción acrosomal; todas estas características parecen concederle una mayor susceptibilidad a los cambios de temperatura y que los procesos de conservación seminal se vean comprometidos en su eficacia (Williams, 2013; Trujillo *et al.*, 2017).

3.3 Factores que afectan la calidad seminal de verracos

El verraco tiene un gran impacto en la eficiencia reproductiva, ya que el semen de un solo verraco es utilizado para Inseminar de 750 a 1000 cerdas al año dependiendo de la concentración por dosis, este impacto determina que un solo verraco va influir en un gran número de cerdas, por esta razón el conocimiento de los aspectos básicos que pueden modificar la óptima fertilidad del verraco (Gadea *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2006; Smital, 2009; Williams, 2013).

3.3.1. Raza o línea genética

La línea genética o raza afecta de forma directa ciertas características reproductivas del verraco; pubertad precoz, volumen y la concentración espermática (Audet *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005); sin embargo, con los nuevos métodos computarizados de evaluación, se ha determinado que la raza influye también sobre la cinética de motilidad y fertilidad del espermatozoide de verraco (Wolf y Smital, 2009; Knecht *et al.*, 2017; García *et al.*, 2017). Algunas razas pueden presentar alteraciones en la estructura de los espermatozoides, en este sentido Ramírez *et al.*, (2000) reportaron en México, el volumen del eyaculado del cerdo Pelón mexicano fue 39 y 155 ml, menores a los obtenidos con los cerdos de líneas comerciales, en otro estudio Rueda *et al.*, (2006), Knecht *et al.*, (2014) reportaron que en razas Large White, Landrace y Duroc x Pietrain el volumen seminal obtenido fue de 258.6 ml, 251.6 ml y 245.1 ml respectivamente, además la concentración para estas mismas razas fue; 345.1×10^6 ml, 367.7×10^6 ml y 439.9×10^6 ml, mostrando diferencia incluso entre los mismos individuos; sin embargo, el efecto de la raza esta correlacionado con ciertas épocas del año (Rocha *et al.*, 2005; Smital, 2008; Hernández y Alemán, 2008; Wolf y Smital 2009; Knecht *et al.*, 2014; García *et al.*, 2017) Broeckhuijse *et al.*, (2012), mencionan que el efecto individual del verraco explica el 29% y 31% de la variación total de fertilidad y número de lechones nacidos vivos en las cerdas; mientras que la línea genética explica el 22% y 18% de la variación con la fertilidad y prolificidad.

3.3.2 Edad y frecuencia de colección del verraco

Los verracos son utilizados como reproductores cuando alcanzan la madurez reproductiva, que se determina principalmente por la edad (Rocha *et al.*, 2005; Quintero-Moreno *et al.*, 2009) por lo general entre los 7 y 9 meses de edad los verracos presentan la pubertad y con ello el inicio del entrenamiento en centros la colección de semen para IA, siendo de importancia los intervalos de colección. Está demostrado que intervalos demasiado largos entre colección, conducen al aumento de malformaciones y disminución de la calidad del eyaculado (Gadea *et al.*, 2003; López, 2017; Velázquez, 2013; Kenecht *et al.*, 2017). En estudios

realizados por Quintero-Moreno *et al.*, (2009) comparando el efecto de la edad sobre las características morfométricas de la cabeza del espermatozoide (largo, ancho, área y perímetro) en verracos mayores y menores a 18 meses de edad, reportan que los espermatozoides provenientes de cerdos mayores de 18 meses presentan hasta un 20% menos de espermatozoides de menor tamaño que los cerdos más jóvenes, estas características morfométricas se correlacionan para determinar semen de buena fertilidad.

La interacción entre la edad y los intervalos de colección en los verracos, varía acorde las necesidades de los centros de inseminación, (Gadea *et al.*, 2003; Henao *et al.*, 2004; Del Valle, 2017), trabajos descritos por Knecht *et al.*, (2017) infieren que en los verracos jóvenes (8 a 9 meses), el mayor volumen seminal se obtiene dando intervalos de 3, 4 y 5 días, para el caso de verracos con edades de 10 a 12 meses, 13 a 18 meses y 19 a 24 meses, los mejores resultados en el volumen de semen se alcanzaron después de intervalos de 7 días, en este sentido también se ha observado que el volumen obtenido después de intervalos de 7 días en otoño registró los mejores valores de eyaculado (300ml), caso contrario en los verracos jóvenes (160 ml). De la misma manera Rocha *et al.*, (2005) reportan que los verracos con edades de uno y dos años se obtiene la mayor producción de dosis seminales a intervalos de colecta de cinco días. En el mismo sentido Wolf y Smital (2009) especifican que cuando la frecuencia de colecta es realizada a intervalos cada 2 a 3 días la concentración espermática disminuye hasta 100×10^3 espermatozoides por mm^3 . Por otro lado Velázquez (2013) menciona que la concentración espermática se incrementa considerablemente a partir de los 7 a 8 meses y se mantiene hasta la etapa de adulto, en un ambiente tropical, la vida reproductiva de un verraco es de 4 años y 6 años en climas templados.

3.3.3. Efecto nutricional

Las deficiencias de energía, proteína, minerales o vitaminas, tienen un efecto sobre el comportamiento sexual o libido (Audet *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2006; Contri *et al.*, 2011). Esta disminución de la libido está asociada a la relación de los niveles plasmáticos de 17β -estradiol, este efecto es más marcado cuando se

combinan bajos niveles de proteína y niveles energéticos, aumentando el número de rechazos a la monta, (Wolf y Smital, 2009; Velásquez, 2013; López, 2017), es común que el semental sea alimentado con concentrados elevados en energía y poca proteína, como consecuencia el aumento de peso se hace considerable, en este sentido Velásquez (2013) menciona que la obesidad repercute considerablemente en la composición del semen, afectando principalmente el volumen total del eyaculado y que además las malformaciones espermáticas aumentan considerablemente. De la misma manera, López (2017) menciona que las deficiencias energéticas o proteicas, disminuyen la producción de semen, especialmente en verracos jóvenes, las deficiencias en lisina, metionina y triptófano ocasionan cambios histológicos y citológicos a nivel de los testículos, afectando a la espermatogénesis (Audet *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2006;).

3.3.4. Efecto del medio ambiente

El medio ambiente influye en las características seminales del verraco, este no es de gran eficacia por su disposición anatómica, por lo que se ha descrito para la espermatogénesis en el verraco se requieren temperaturas inferiores a la corporal, puesto que la temperatura ambiental elevada infieren la producción seminal (límite máximo entre 28 y 30° C), se ha descrito que varios días con temperaturas mayores a 22° C, pueden desencadenar la disminución de la concentración y motilidad espermática, además de que se incrementan las malformaciones morfológicas del espermatozoide (Henaó *et al.*, 2004; Hernández y Alemán, 2008; Wolf y Smital, 2009; Velásquez, 2013). Se ha observado que el aumento de la temperatura ambiental, el verraco sufre estrés térmico notorio sobre la calidad seminal del verraco entre la sexta y octava semana después del estrés calórico (Rocha *et al.*, 2005; Velásquez, 2013; Knecht *et al.*, 2014).

La eficiencia reproductiva de los verracos es afectada por el efecto de la temperatura ambiental elevada que induce un estrés térmico, disminuyendo la capacidad de termorregulación testicular necesaria para la espermatogénesis (Henaó *et al.*, 2004; Smital, 2009; Knecht *et al.*, 2014), en este sentido (Henaó *et al.*, 2004) establecen que es posible que los verracos de zonas tropicales

desarrollen una respuesta de favorable de adaptación, lo que les permite una adecuada termorregulación testicular, favoreciendo la correcta función de los túbulos seminíferos logrando mantener la calidad seminal durante períodos prolongados de calor. En este mismo sentido, Hernández y Alemán (2008) señalan los efectos negativos que tienen las temperaturas elevada sobre la calidad seminal. De la misma manera Knecht y Środon (2014) evaluaron el efecto de las estaciones del año sobre la línea genética y la calidad seminal de verracos sometidos a cambios de temperatura estacional, puntualizando que durante las estaciones de otoño-invierno la concentración espermática es mayor que durante la primavera y verano, este efecto se relaciona completamente con el proceso de espermatogénesis. Por otro lado, López *et al.*, (2017) demostraron que en aquellos verracos expuestos a 34.5 °C durante 8 horas y a 31.0 °C durante 16 horas en 90 días, la motilidad espermática y las anomalías del espermatozoide aumentaron considerablemente en el eyaculado.

3.4. Métodos de colección de semen

Diversos métodos han sido descritos para la colección seminal del verraco, los cuales involucran la estimulación directa de la musculatura del aparato reproductor del macho o que simulan la copula en una cerda (Saravia *et al.*, 2005; Kubus, 2010).

3.4.1. Vagina artificial

La vagina artificial (VA) construida de material plástico (PVC) con una cubierta externa firme y un forro interno de látex, simulando la vagina de la cerda, para poder producir el estímulo adecuado (**Fig. 5**), la vagina debe mantenerse a una temperatura mayor que la corporal del verraco destinado a la colección, además debe ejercer presión sobre el pene para lograr la eyaculación, el forro interno debe ser lubricado con gel no espermicida, la VA, mantiene igual temperatura evitando el deterioro de los espermatozoides por shock por frío, además se utiliza una cerda en estro que permita ser montada por el macho, actualmente este método resulta ineficaz debido a los inconvenientes que presenta para realizarse



Figura 5. Vagina artificial para cerdos

(Mercado, 2011; Córdova *et al.*, 2015; Knox, 2016; Del Valle, 2017; Knecht *et al.*, 2017).

3.4.2. Electroeyaculador

Este método se desarrolló para aquellos verracos cuyo valor genético es muy valioso y que por factores como la edad, el peso o alguna discapacidad locomotora les impide la monta sobre un maniquí de colección o la cerda, el electroeyaculador (**Fig. 6**), se introduce por el recto del animal y ejerce estímulos eléctricos sobre nervios pélvicos y las glándulas sexuales accesorias provocando el reflejo de eyaculación (Mercado, 2011; Wolf y Smital, 2009; Del Valle 2017; Knecht *et al.*, 2017).



Figura 6. Electroeyaculador

3.4.3. Técnica de la mano enguantada

Es el método más generalizado para la colección del semen debido a su facilidad en el manejo y lo económico que resulta el material a utilizar, es necesario que para el empleo de esta técnica se cuente con un lugar específico para la colección, ya que el espacio debe ser seguro para el verraco, higiene en la toma de la muestra seminal y un operador con experiencia en la técnica. Para



Figura 7. Colección seminal mediante la técnica de mano enguantada

la colección de semen por esta técnica previamente los verracos son entrenados para montar un potro o maniquí que se encuentra fijo dentro del corral (**Fig. 7**), previo entrenamiento del verraco entre los 6-8 meses de edad en un periodo de 1 a 7 días. La colección de semen se lleva a cabo por la presión ejercida por la mano sobre el glande del verraco asimila los anillos del cuello uterino de la cerda llevándose a cabo el reflejo de eyaculación, el tiempo varía de 8 a 25 minutos.

(Wolf y Smital, 2009; Kubus, 2010; Oberlender *et al.*, 2012; Córdova *et al.*, 2015; Estrada-Paqui, 2017; Del Valle *et al.*, 2017; Knecht *et al.*, 2017).

3.5. Evaluación seminal en el verraco

La calidad del eyaculado ha sido tradicionalmente evaluada con el espermiograma clásico, que está basado en la aplicación de una serie de pruebas de rutina en los centros de inseminación, estas incluyen el examen macroscópico y microscópico del eyaculado en los que se determina el volumen, la concentración, la motilidad, el estado del acrosoma y la morfología, aunque la información combinada ofrece buena estimación de la calidad seminal, algunas ocasiones se presentan espermiogramas normales que son de verracos subfértiles, o que inician un proceso decreciente de fertilidad, es por ello que se han generado avances tecnológicos en equipos y pruebas para generar las mejores medidas de predicción de fertilidad. Gadea, (2001) clasifico en dos grupos los caracteres seminales relacionados con la fertilidad, el grupo de caracteres compensables (motilidad y morfología); el efecto negativo de estos parámetros no afecta completamente la fertilidad, para contrarrestar el efecto negativo de estos es necesario aumentar la concentración de células espermáticas al momento de la IA, para el grupo de caracteres no compensables (vacuolas nucleares, deficiencias morfológicas que supriman el movimiento, y una estructura defectuosa de la cromatina) este grupo afecta negativamente la función del espermatozoide durante la concepción y del desarrollo embrionario

3.5.1. Motilidad espermática

La motilidad espermática es el indicador de la calidad seminal e indica que cuanto más rápido y rectilíneo sea el desplazamiento mayor será su potencial fecundante. Este parámetro puede ser evaluado microscópicamente con una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica a 37°C, se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio óptico con objetivo de 40x, estimándose el porcentaje de espermatozoides en movimiento en una escala de 0 a 100%, sin embargo; aunque esta evaluación es valiosa, no siempre es exacta ya que está sujeta a la valoración del técnico, para superar esta

variabilidad en los resultados de la evaluación del semen (Gadea, 2001; Broekjuijse *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2013). Se han propuesto un sistema de análisis del semen asistido por computadora llamado comúnmente por sus siglas en inglés, CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis), este equipo permite un análisis objetivo y asigna un valor continuo del número exacto de células espermáticas que fueron móviles e inmóviles (analiza más de 400 células por muestra) además de indicar la velocidad, el tipo de movimiento, la trayectoria recorrida y el desplazamiento angular de cada espermatozoide, no obstante, estos sistemas tienen inconvenientes, por la variabilidad en función de la temperatura, la actividad inhibitoria del plasma seminal y la concentración espermática, lo que modificaría el resultado. La motilidad de una muestra seminal fresca es del 80-90%, una vez diluido, refrigerado y almacenado se considera satisfactorio para su uso en la IA, si mantiene el 60%, esta evaluación de la motilidad puede estar afectada por factores como las proteínas en el plasma seminal asociadas con la producción de energía mitocondrial, la fosforilación de las proteínas o incluso un mal manejo de temperatura durante la evaluación (Gadea, 2001; Rodríguez *et al.*, 2008; Mayorga-Torres *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2015; Baishya *et al.*, 2016; Quintero *et al.*, 2017).

3.5.2. Viabilidad espermática

Esta prueba adquiere su relevancia al ser esta estructura la responsable de los procesos de capacitación y reacción acrosomal en la unión con el ovocito, la viabilidad puede ser estudiada desde el punto de vista estructural (**Fig. 8**), mediante la utilización de tinciones o bien valorar su funcionalidad, mediante un test hiposmótico o con distintas técnicas con fluorocromos que permiten evaluar la funcionalidad espermática (De Jesús *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2009; Restrepo *et al.*, 2013). Para evaluar la viabilidad del espermatozoide, se ha utilizado de manera sencilla y confiable la tinción de eosina nigrosina en un microscopio óptico y por conteo de

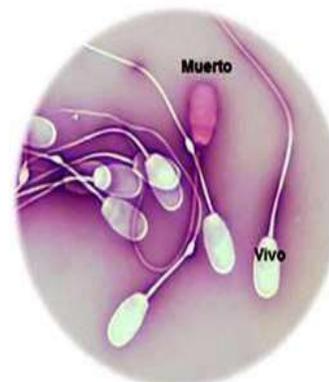


Figura 8. Tinción de Eosina-nigrosina en la evaluación de viabilidad espermática

100 espermatozoides, se determina el porcentaje de espermatozoides viables; el fundamento de esta prueba indica la diferencia entre aquellos espermatozoides con membrana plasmática afectada, permitirán el paso de la coloración (púrpura o rosa) caso contrario en aquellos espermatozoides con membrana plasmática intacta, la tinción conjunta de rosa de bengala y azul de victoria saturado ha sido utilizada en los espermiogramas con la finalidad de observar anomalías de la cabeza espermática (De Jesús, 2007; González *et al.*, 2013; Córdova *et al.*, 2015) otras tinciones de viabilidad son la de Wells y Awa que utilizan alcohol etílico, eosina B y verde brillante; mediante un microscopio de luz convencional de 200 espermatozoides, para identificar el número de células espermáticas que presentan la cresta apical lisa y entera (Díaz *et al.*, 2009; Rubio-Guillen *et al.*, 2009; González *et al.*, 2013; Quintero *et al.*, 2017). También se ha utilizado la tinción, azul de toluidina, en la cual se observan 500 espermatozoides la cual permite evaluar la relación entre la integridad de la cromatina y las morfo anomalías de la cabeza espermática (González, 2013). En algunos centros de inseminación especializados incluyen pruebas por citometría de flujo, que en comparación con las evaluaciones rutinarias, permite mediciones de un gran número de células espermáticas (más de 10000) en un tiempo relativamente corto, dando diferentes subconjuntos de células identificadas y cuantificadas, relacionando los parámetros de integridad de espermatozoides, se implementan sustancias fluorescentes de alta especificidad, las tinciones más comunes son el SYBR-14 y el ioduro de propidio, rodamina 123, naranja de acridina y Hoescht 33342, la sonda fluorescente SYBR-14 tiñe el DNA de espermatozoides viables de color verde brillante, mientras que el ioduro de propidio penetra los espermatozoides no viables, tiñendo el DNA de color rojo brillante (Rubio-Guillen *et al.*, 2008; Broekhuijse *et al.*, 2012; Mayorga-Torres *et al.*, 2013; Baishya *et al.*, 2016).

3.5.3. Morfología

Las anomalías del espermatozoide se presentan en la cabeza, pieza media, flagelo (**Fig. 9**), y algunos defectos en el acrosoma, se utilizan las tinciones Giemsa y Rosa de bengala, (Broekhuijse *et al.*, 2011; Oberlender *et al.*, 2012; Córdova *et al.*, 2015). El número de espermatozoides normales y anormales se expresa en porcentaje, respecto a estas dos técnicas. Oberlender *et al.*, (2012) compararon el uso de ambas técnicas para evaluar la morfología del semen del verraco; concluyendo que el porcentaje de cambios de la cabeza, acrosoma, pieza intermedia y el total de cambios morfológicos.

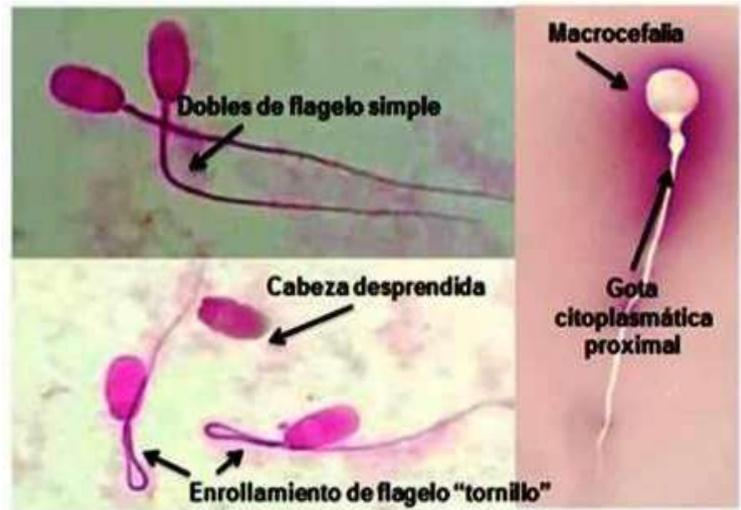


Figura 9. Anormalidades presentes en espermatozoide de verraco

3.5.4. Concentración espermática

La concentración seminal se evalúa por técnicas que implementan el conteo de las células mediante un hematocitómetro o mediante sistemas automatizados de espectrofotometría, existen diferentes tipos de cámaras (**Fig. 10**) para el recuento de espermatozoides de manera comercial la cámara, Microcell®, Horwell®, Burker®, de las cuales utilizan una muestra seminal sin dilución, contrario a la cámara Neubauer®; sin embargo, esta última es la más utilizada en los centros de inseminación por su practicidad y confiabilidad al evaluar la concentración (Rodríguez *et al.*, 2008; Oberlender *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2015). La cámara Neubauer®, tiene una profundidad de 0.1 mm dividido en 25

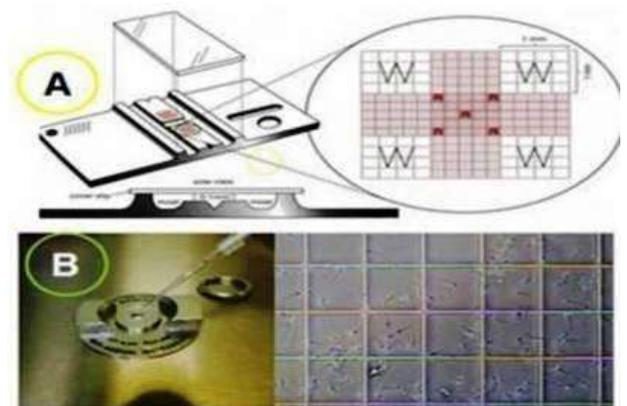


Figura 10. Evaluación de la concentración espermática
A) Cámara de Neubauer
B) Cámara de Makler

cuadrados grandes y 16 pequeños; cada cuadrado grande tiene 1x1 mm, la cámara se llena con la suspensión de espermatozoides en una solución fijadora de formaldehído y el recuento se lleva a cabo usando un microscopio de luz bajo objetivo de 40x (Saravia *et al.*, 2005; Kubus, 2010; Córdova *et al.*, 2015). No obstante Cardona *et al.*, (2008) compararon la concentración espermática de muestras seminales utilizando la cámara de Makler® y la cámara de Neubauer®; el promedio de las concentraciones fue 107.8×10^6 y 106.2×10^6 espermatozoides/ml respectivamente, no se encontraron diferencias significativas entre ambas cámaras.

3.5.5. Evaluación tolerancia osmótica

Adicionalmente, la integridad funcional de la membrana plasmática a cambios osmóticos puede ser considerada como un indicador de la funcionalidad de los espermatozoides (Fig. 11), de manera sencilla, puede ser evaluada, mediante un test HOST / Hypoosmotic Swelling Test (Osorio *et al.*, 2007; Rubio-Guillen *et al.*, 2009; Williams, 2013b; Hernández *et al.*, 2015). Su fundamento es someter a condiciones

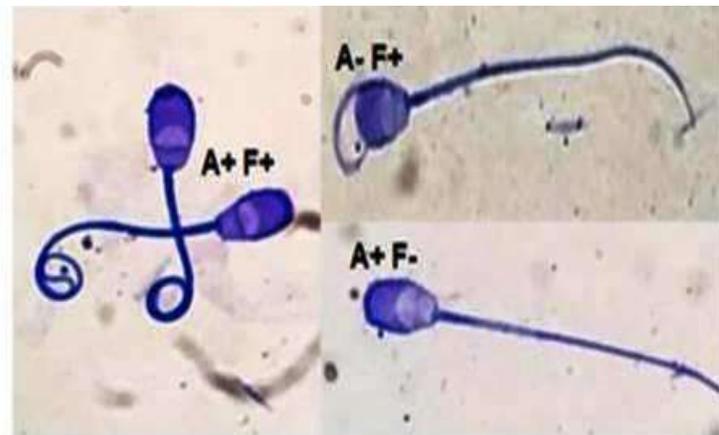


Figura 11. Prueba dual HOST/Azul de comassie
A+: Acrosoma íntegro A-: Acrosoma dañado
F+: Reacción del flagelo F-: Sin reacción de flagelo

hiposmóticas a los espermatozoides, generando la entrada de agua en la célula, la misma que realiza un intercambio entre los líquidos para mantener la dinámica de equilibrio intracelular y el entorno extracelular logrando igualar la presión osmótica; estos mecanismos de intercambio de fluidos se activan ocasionando un hinchamiento y enrollamiento en la región del flagelo (Díaz *et al.*, 2009; Restrepo *et al.*, 2013; González *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2015;). Solamente los espermatozoides bioquímicamente activos permiten la entrada de agua y muestran diferentes grados de turgencia, esta respuesta se asocia con el grado de integridad normal y de actividad funcional de la membrana (Osorio *et al.*, 2007; Cardona-Maya *et al.*, 2007; Quintero-Moreno *et al.*, 2017). En este contexto

Rubio-Guillén, (2009) observó una alta correlación entre la respuesta del espermatozoide a un medio hiposmótico y su capacidad de penetración al ovocito entre los eyaculados frescos y semen descongelados 71.85% y 50.82%, respectivamente.

4. Conservación seminal

La industria porcina a lo largo del tiempo ha desarrollado estrategias que permitan el máximo aprovechamiento de la capacidad reproductiva de los verracos, utilizando diluyentes que permiten la conservación del semen de forma práctica, estos diluyentes proporcionan nutrientes de mantenimiento metabólico del espermatozoide, además de brindar protección ante variaciones de temperatura, el control de pH, equilibrio de la presión osmótica y de impedir la proliferación microbiana (Cuenca *et al.*, 2017). Es necesario reducir la actividad metabólica del espermatozoide para lograr conservarlos durante periodos prolongados, esto se logra mediante la dilución y la reducción de la temperatura (Gadea, 2003); sin embargo, autores como Flores *et al.*, (2018), mencionan que durante la conservación seminal, ocurre un efecto negativo, al incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como consecuencia la disminución en la motilidad y fertilidad. En la actualidad la IA se realiza con semen fresco, refrigerado, encapsulado o congelado, cada tipo de conservación brinda distintas posibilidades de aplicación así como también requiere un manejo de diferente complejidad (Stornelli *et al.*, 2001).

4.1 Semen fresco-diluido almacenado a 17 °C

Se estima que más de 90% de las inseminaciones en el mundo, son realizadas con semen líquido preservado entre 15 °C y 20 °C durante 1 a 5 días (Hernández *et al.*, 2008; Torreta *et al.*, 2010). Principalmente este método de conservación (**Fig. 12**) ha demostrado su validez reproductiva hasta 85% de fertilidad, comparada con la monta natural (MN) de 76%, representando una prolificidad en las cerdas inseminadas con tamaños de camada de 12.5 lechones, comparado con los 10.5 lechones en promedio que se obtienen con MN, es por ello que es la más común para la producción de cerdo de engorda (Fuentes *et al.*, 2006; Alemán

et al., 2006; Cuenca *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2018). En el mismo sentido Torreta *et al.*, (2010) menciona que existe mayor número de reportes de fertilidad y prolificidad que han denotado el efecto positivo del uso de la IA con semen diluido almacenado a 15 °C, de la misma manera Hernández *et*



Figura 12. Cámaras de almacenamiento de semen a temperaturas de 15 ° y 17 °C

al., (2008) utilizando semen almacenado compararon el efecto de la MN y la IA, obtuvieron una fertilidad mayor (85%) que la MN (75%). De la misma manera Rogozarski *et al.*, (2013) obtuvo un 94% y 78% fertilidad comparando la IA postcervical y la IA cervical utilizando semen almacenado a 15 °C, no obstante es considerable, el daño que sufre el espermatozoide porcino durante el almacenamiento, siendo la refrigeración la causa principal de pérdida de motilidad y viabilidad espermática, respecto a ello autores como Hernández *et al.*, (2016) al comparar la MN y la IA a 15 °C reportaron fertilidad de 95% y 80% respectivamente, de la misma manera Alemán *et al.*, (2006) reporta un efecto contrario en la fertilidad con el uso de la IA utilizando semen almacenado a 17 °C (55% fertilidad) y semen a 37 °C (79% fertilidad), de la misma manera Obando *et al.*, (2012) reportaron fertilidades de 75% utilizando semen almacenado de 24 horas, por otro lado a pesar de ser el método más comercial en la industria porcícola, adquiere un costo extra en la economía del productor, al ser necesario contar con una cámara de conservación que permita almacenar la segunda dosis inseminante necesaria para un segundo servicio en la cerda y poder obtener una tasa de fertilidad satisfactoria (Luchetti *et al.*, 2016; Quiroz-Rojas *et al.*, 2018).

4.2 Semen encapsulado y almacenado a 15 °C

La micro encapsulación es una tecnología de recubrimiento desarrollada desde los 90's utilizada para brindar protección a sustancias y agentes (antioxidantes, pigmentos, aceites poliinsaturados, vitaminas, minerales, moléculas bioactivas, vacunas, probióticos, entre otros materiales sensibles) del medio ambiente que puede alterar su composición (humedad, temperatura, pH, oxidación, luz). El uso de esta tecnología en la reproducción (**Fig. 13**) fue hasta los años 2000 (Faustini *et al.*, 2004; Vigo *et al.*, 2009; Spinaci *et al.*, 2013), en este sentido Valenzuela *et al.*, (2013) indicaron que esta técnica emplea alginato de bario (Ba) o calcio (Ca) como



Figura 13. Semen de verraco encapsulado

un recubrimiento formando una membrana polimérica semipermeable, que permite ser almacenado en una cámara de conservación a temperaturas de 15 °C a 17 °C, se ha demostrado que su principal ventaja es la liberación controlada de los espermatozoides en el útero de la cerda, alcanzando mayores concentraciones espermáticas al momento de la ovulación (Sánchez *et al.*, 2017). En la especie porcina la encapsulación del semen ha tenido ciertas modificaciones por las particularidades que presenta el espermatozoide. Faustini *et al.*, (2004) al evaluar la calidad del semen encapsulado y almacenado a 18° C durante 72 horas reportaron un aumento del daño acrosomal (77%) comparado con el eyaculado sin encapsular (55%). En este mismo sentido Vigo *et al.*, (2009) compararon el semen encapsulado y sin encapsular, en la inseminación de cerdas durante diferentes estaciones del año, los resultados de fertilidad y prolificidad no mostraron diferencia entre ambos tratamientos, concluyen que la liberación lenta y gradual de los espermatozoides encapsulados (dosis única) podría ser una alternativa en la IA. Spinaci *et al.*, (2013) evaluaron mediante patrones de tinción; fosforilación de tirosina de proteínas y la integridad de membrana de semen sexado líquido y encapsulado almacenado a 18 °C durante 72 horas, obteniendo una disminución significativa de la integridad de la membrana en el semen líquido

(57.4%) comparado con el semen encapsulado (81.88%) por otro lado Sánchez *et al.*, (2017) reportan que la tasa de fertilidad fue mejor (86% y 84%) al utilizar semen encapsulado comparado con semen sin encapsular en la IA de cerdas.

4.3 Semen criopreservado

Este método de conservación de semen a largo plazo ha representado ventajas económicas importantes y deseables para criopreservar la diversidad genética de las distintas especies animales, con este método se superan las restricciones de transporte de verracos de alta



Figura 14. Criopreservación de semen de verraco

genética hacia distintos países (**Fig.14**), las limitantes del tiempo de conservación como el semen fresco-diluido no son un problema, incluso se han establecido bancos de semen criopreservado de líneas de importancia económica. En la especie porcina se documentaron los primeros trabajos de congelación seminal hace más de 30 años (Carpio *et al.*, 2008; Medina-Robles *et al.*, 2008; Wasilewska y Fraser, 2017; Guimarães *et al.*, 2017); sin embargo, su uso se ha limitado principalmente por tener baja supervivencia espermática, representando el 2% a nivel mundial (Roa *et al.*, 2005; Carpio *et al.*, 2008; Medina-Robles *et al.*, 2008; Knox, 2015; Flores *et al.*, 2018).

Esta sucintamente documentado que los espermatozoides porcinos son altamente sensibles a los procesos durante la congelación y aún más durante el proceso de descongelación, ya que se producen alteraciones estructurales afectando de manera irreversible la membrana plasmática y el núcleo espermático por la formación de hielo intracelular, la producción excesiva de radicales libres, que en altas concentraciones generan estrés oxidativo y como consecuencia ocurre una lipoperoxidación de membrana plasmática, por la concentración elevada de ácidos grasos polinsaturados que posee, estos daños ocurren en el semen porcino por su relación colesterol-fosfolípidos de 0.2 en la membrana plasmática, ya que esta relación es importante en la fluidez de la membrana, las especies con mayor

contenido de colesterol en su membrana son menos susceptibles a los daños causados por las bajas temperaturas, por ello importantes investigaciones han sido realizadas adicionando antioxidantes para disminuir tan nocivo efecto en el espermatozoide (Gadea *et al.*, 2003; Funahashi y Sano, 2005; Roa *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2018). Con este método de conservación, independientemente del lugar de depósito del semen, se han obtenido resultados de motilidad menores al 50%, viabilidad de 35-40% y fertilidad que varían de 47% hasta 70% (Medina-Robles *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2015). Knox (2015) menciona que en la producción de semen congelado el 60% de los espermatozoides pierden su viabilidad, por lo que la producción de pajillas con semen congelado sería de entre 5 y 10 dosis con concentraciones de cuatro a seis mil millones de espermatozoides. Okazaki y Shimada (2012) reportan una fertilidad de 80.2% y prolificidad de 10.1 lechones utilizando semen congelado-descongelado adicionando plasma seminal. Ringwelski *et al.*, (2013) concluyen que para la aplicación práctica utilizando semen congelado-descongelado en cerdas, la mayor fertilidad se obtiene en intervalos de 8 y 16 horas.

4.4 Semen a 5 °C

El tiempo de retención, es el período durante el cual un eyaculado, ya sea entero o diluido, se mantiene a 17 °C, para su posterior almacenamiento en frío o la criopreservación (Casas y Althouse, 2013). De particular interés ha sido la creación de la formulación de extensores que permitan mantener el semen porcino funcional a menores temperaturas, mientras que en otras especies como equinos y bovinos es una práctica común lograr la supervivencia de los espermatozoides a 5 °C, en los espermatozoides porcinos se induce una remodelación en la membrana plasmática que los induce al shock frío, afectando la funcionalidad del espermatozoide (Aurich, 2008; Nguyen *et al.*, 2016; Schäfer *et al.*, 2017, Yeste *et al.*, 2018). Para lograr la supervivencia del espermatozoide porcino al enfriamiento, es necesaria la adición de extensores que le otorguen una barrera de protección a la membrana plasmática, principalmente se han utilizado la yema de huevo o leche descremada, por su practicidad en la elaboración y el bajo costo, además de ofrecer tasas de fertilidad aceptables (Foote, 2002; Aurich, 2008; Barrientos *et al.*,

2009; Malo *et al.*, 2010; Casas y Althouse, 2013). Fraser y Strzezek (2004) reportaron mediante un ensayo de la estructura de la cromátida del espermatozoide, la integridad del ADN, comparando el extensor a base de yema de huevo de gallina y de avestruz en el almacenamiento de semen de verraco a 5 °C, concluyeron un efecto significativo en las muestras almacenadas con yema de huevo de gallina. Saravia *et al.*, (2007). Reporta un efecto positivo sobre la motilidad espermática del semen enfriado a 5 °C utilizando extensor a base de yema de huevo y lactosa. Namula *et al.*, (2013) reportaron índices de motilidad significativamente más altos cuando adicionaron 7.5 y 15 mg / mL de leche descremada en el almacenamiento de semen a 5 °C durante cuatro semanas. Grossfeld *et al.*, (2016) reportaron una disminución de la motilidad y aumento en la reacción acrosomal de espermatozoides diluidos y almacenados a 5 °C. Aunado a un extensor que brinde la protección al enfriamiento, se hace necesario el descenso gradual de la temperatura para lograr el efecto deseado en la permeabilidad de la membrana, en este contexto, Casas y Althouse, (2013) y Schäfer *et al.*, (2017) obtuvieron diferencias significativas en sus tratamientos cuando el semen de verraco era almacenado a 17 °C durante 24 horas previas al enfriamiento a 5 °C, ciertos autores han propuesto que el enfriamiento gradual del eyaculado, induce en los espermatozoides un cambio en la distribución de elementos de la membrana plasmática, una versión similar a la capacitación dentro de la hembra, al respecto, Barrientos *et al.*, (2009) encontraron que en el espermatozoide del verraco, la actina participa en la regulación del volumen, cuando se encuentra localizada en la región acrosomal del espermatozoide, respalda su posible participación en la capacitación espermática y en la reacción acrosomal, es base a ello la polimerización y despolimerización de la actina se le relaciona en la capacitación, ya que en el espermatozoide del verraco, al inhibirse a nivel *in vitro* la polimerización de la actina, se bloquea la capacidad fecundante del espermatozoide. Asociado a la susceptibilidad que presenta el semen de verraco; la contaminación del eyaculado con agentes patógenos, ejerce un efecto negativo mayor en este sentido, autores como Okazaki *et al.*, (2010) mencionan que la contaminación bacteriana genera un deterioro en el eyaculado, afectando

principalmente la motilidad y la vida útil de almacenaje del semen; incluso se ha descrito el efecto nocivo sobre la fertilidad de las hembras (Andrabi *et al.*, 2001; Gómez-Coronado, 2018). En este contexto Gadea, (2003) menciona que las bacterias presentes en el tejido testicular y glándulas accesorias así como el método de colección de mano enguantada son las principales causas de la contaminación de un eyaculado, en el mismo sentido Maroto-Martín *et al.*, (2010) reportan que 62% de eyaculados enteros y 9.5%



Figura 15. Semen de verraco enfriado a 5 °C

diluidos, que fueron exportados fueron diseminadores de varias enfermedades de tipo bacteriano, por ello los antibióticos han sido indispensables en la formulación de diluyentes; sin embargo, se ha generado el problema de la alta resistencia bacteriana, y con ello la necesidad de la combinación de antibióticos que han inducido toxicidad en el espermatozoide (Aurich, 2005; Saravia *et al.*, 2007; Casas y Althouse, 2013; Schulze *et al.*, 2015; Gómez-Coronado, 2018) sin embargo, el enfriamiento seminal a 5 °C (**Fig. 15**) está revolucionando el desarrollo de diluyentes libres de antibióticos, ya que está demostrado que las bacterias se inhiben a estas temperaturas de almacenamiento (Pagl *et al.*, 2006; Casas y Althouse, 2013; Santos *et al.*, 2016; Luther *et al.*, 2018;). En este sentido, Gómez-Coronado (2018) reporta la inhibición del crecimiento bacteriano en semen de verraco almacenado a 5 °C; sin embargo, la motilidad y el daño acrosomal presentado en los espermatozoides fue significativo ya que el diluyente utilizado no estaba diseñado para el almacenamiento a dicha temperatura, resultados favorables se obtuvieron al probar un diluyente de almacenamiento a 5 °C, reportado por Grossfeld *et al.*, (2016) compararon el almacenamiento de semen a 5 °C y 17 °C, para probar la efectividad de almacenamiento del diluyente Androstar ⁺5, libre de antibiótico y el diluyente Androstar Premium que contiene gentamicina, los eyaculados fueron almacenados durante 72 horas, no se encontró diferencia estadística significativa en la evaluación de la motilidad

progresiva y el daño acrosomal, concluyendo la posibilidad del desarrollo de diluyentes sin antibióticos almacenados a 5 °C.

Los avances tecnológicos han permitido establecer nuevos parámetros que permiten formular respuestas positivas para el manejo del semen de verracos, proponiéndose así que la luz emitida sobre las muestras seminales mejora la actividad mitocondrial ya que la estimulación de estas moléculas se convierte en un aumento en la producción de ATP y Ca^{2+} de los espermatozoides, los cuales utilizan ATP como fuente de energía para las funciones clave durante el proceso de fertilización. En este sentido Nguyen *et al.*, (2016) evaluaron la concentración de ATP en muestras seminales almacenadas durante 72 horas a 17 °C y 5 °C, indicando que el proceso de enfriamiento a 5 °C, afecta significativamente la concentración de ATP y ADP, pero no el almacenamiento a esta misma temperatura, esta carga de energía está altamente correlacionada con la proporción de espermatozoides con su membrana intacta y que resistieron el shock por frío y lograron estabilizar la membrana. De la misma manera Yeste *et al.*, (2018) lograron un efecto significativo en la conservación de los espermatozoides mediante la emisión de luz sobre pequeñas muestras seminales y con esta aportación esperan a futuro lograr maximizar el efecto en las dosis comerciales. Por otro lado pocas han sido las investigaciones utilizando semen enfriado y almacenado a 5 °C en la IA de cerdas, autores como Namula *et al.*, (2013) reportan que de un grupo de cuatro cerdas inseminadas con semen a 5° C adicionado con 7.5 mg/ ml de leche descremada, solo dos cerdas quedaron gestantes y el tamaño de camada fue de ocho lechones totales. Por su parte, Grossfeld *et al.*, (2016) inseminaron 40 cerdas multíparas y 10 primerizas comparando el diluyente Androstar 5 °C y Androstar 17 °C, observando fertilidad de 98% y 90% respectivamente.

5 ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LA CERDA

5.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la cerda

Uno de los aspectos de mayor efecto y transformación en la porcicultura reside principalmente, en los rendimientos productivos y reproductivos de la hembra, variaciones que modifiquen estos aspectos como la fertilidad y la prolificidad se verán reflejados de manera negativa en la rentabilidad del sistema de producción, actualmente es necesario alcanzar tasas de fertilidad del 85% y producir camadas con 12 a 14 lechones nacidos vivos, para alcanzar adecuados parámetros de eficiencia productiva (Del Valle, 2017). Por lo tanto, se ha buscado el aumento en el mejoramiento de las técnicas reproductivas; por medio de IA; sin embargo, para que los resultados sean favorables con el uso de estas tecnologías asistidas, se deben conocer aspectos básicos del ciclo reproductivo de la cerda (Martínez *et al.*, 2015). El tracto reproductivo de la cerda está formado por una serie de estructuras anatómicas donde se llevan a cabo procesos fisiológicos, de manera general el aparato reproductor interno (**Fig.16**) de la cerda es una estructura tubular y las partes que lo componen de craneal a caudal son los ovarios, oviductos (infundíbulo ampolla e istmo), útero (cuernos y cuerpo uterino), cérvix y vagina (Martínez *et al.*, 2015; Estrada-Paqui, 2017).

5.1.1 Ovarios

Se encuentran dentro de la cavidad abdominal, en su parte dorsal, cerca de la punta del útero y caudalmente a los riñones, presentan una forma elipsoidal, pesan aproximadamente 10 g y pueden medir hasta 5 cm (**fig.17**), poseen bordes irregulares como consecuencia de la gran cantidad de óvulos que la cerda es capaz de producir en un solo ciclo estral, lo que confiere al ovario forma similar a la de una mora (Estrada-Paqui, 2017). El folículo es el elemento funcional del ovario, tiene como finalidad el desarrollo y

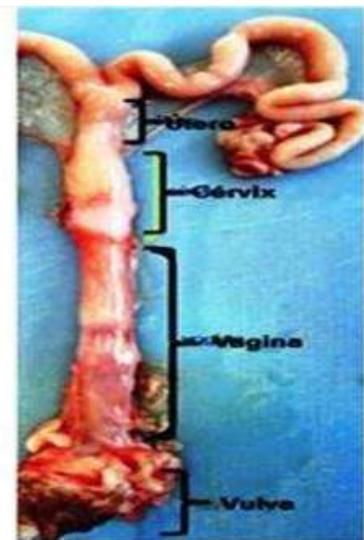


Figura 16. Anatomía del aparato reproductor de la cerda

maduración de un óvulo viable para ser fecundado; además, otra función importante es la producción de estrógenos, por parte de las células de la granulosa. Los estrógenos tienen un importante efecto sobre los órganos sexuales de la cerda: preparar el sistema reproductor para una posible gestación (Martínez *et al.*, 2015).

5.1.2 Oviductos (infundíbulo ampolla e istmo)

Los oviductos son un par de túbulos pequeños de tipo muscular, encargados de recolectar al óvulo una vez que es expulsado del ovario, el infundíbulo es una estructura en forma de embudo cuya función es recolectar al ovocito ovulado, seguido se encuentra la ampolla, que es la dilatación del oviducto con una pared delgada y un diámetro de luz grande, en este sitio se lleva a cabo la fertilización, para que posteriormente continúe su recorrido hacia el útero, a través del istmo, este conecta

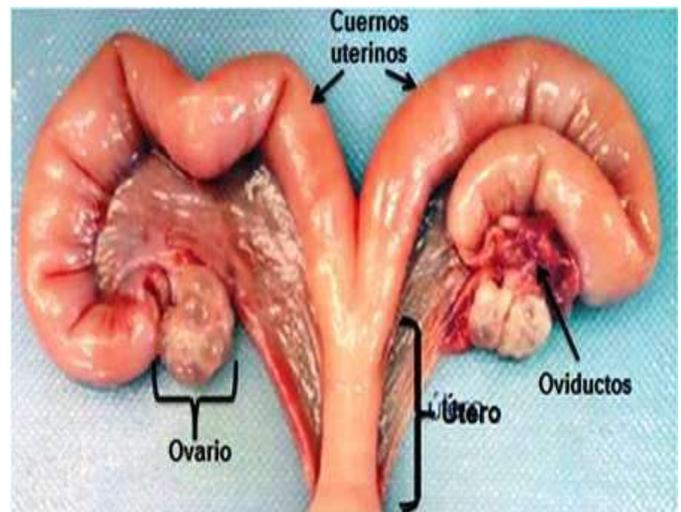


Figura 17. Localización de los cuernos uterinos en la cerda

directamente con el útero, en los oviductos existen células secretoras no ciliadas, encargadas de producir el líquido capaz de capacitar e hiperactivar al espermatozoide, además la musculatura del oviducto comprende dos capas de fibras musculares lisas circulares internas y fibras musculares lisas longitudinales externas, las cuales provocan contracciones en el oviducto, ayudando a desnudar al óvulo para la fecundación y su transporte (Martínez *et al.*, 2015; Estrada-Paqui, 2017).

5.1.3 Útero (cuernos, cuerpo y cérvix)

El útero es la porción del tracto reproductor de la hembra con forma ovoide, de tamaño corto y mide entre 5 a 6 cm, la mucosa lisa que posee se contrae para ayudar a los espermatozoides en su desplazamiento, su función principal es la de brindar el lugar para que el desarrollo embrionario y fetal se establezca; es ahí donde los productos fetales reciben nutrición y protección del mundo exterior,

desde que sucede la implantación hasta el momento del parto, en la cerda se clasifica como bicornual de fusión baja, esto quiere decir que se compone de un cuerpo muy corto y de dos tubas uterinas muy grandes; debido a la adaptación evolutiva para soportar gestaciones de muchos productos (Martínez *et al.*, 2015; Estrada-Paqui, 2017).

Las tubas o cuernos uterinos son dos ramificaciones del útero, de gran longitud; posee numerosos pliegues que le da una apariencia semejante a los intestinos, miden cerca de 120 a 150 cm (Martínez *et al.*, 2015). Son una vía de paso para los espermatozoides y que por medio de contracciones favorecen su desplazamiento, además ocurre la implantación del ovocito y continua su desarrollo fetal (Estrada-Paqui, 2017).

El cérvix, también conocido como cuello del útero, se encarga de dividir al útero de la vagina, es un esfínter formado principalmente por tejido conectivo y por pequeñas cantidades de músculo liso, tiene la finalidad de proteger al útero de la entrada de algún agente patógeno (Martínez *et al.*, 2015). Mide aproximadamente entre 9 - 13 cm de largo, es el sitio de depósito del semen durante la monta natural o durante la inseminación intracervical y tiene la capacidad de contracción durante la gestación y el diestro así como de dilatación durante el estro y el parto (Estrada-Paqui, 2017). Las paredes del cérvix poseen diferentes prominencias llamadas anillos cervicales, en la cerda están dispuestos en forma de rosca o de tirabuzón, lo que permite el acoplamiento perfecto con el pene del macho, cuyo glande tiene forma similar (Martínez *et al.*, 2015).

5.1.4 Vagina y vulva

La vagina es una estructura que se localiza en el canal pélvico, se limita hacia craneal por el cérvix y caudal a la vulva, mide cerca de 10 a 15 cm de longitud, formar parte del canal del parto, de igual forma sirve como receptáculo durante la cópula o la IA, gracias a los pliegues musculares que posee, permiten la distensión de la vagina durante el coito y, sobre todo, durante el parto (Martínez *et al.*, 2015; Estrada-Paqui, 2017).

La vulva es la abertura genital al exterior, tiene forma ligeramente cónica, su abertura está dirigida dorso-caudalmente, a conforman dos labios vulvares, izquierdo y derecho, unidos de forma longitudinal por una comisura dorsal y otra ventral, conteniendo en su ángulo inferior el clítoris, la vulva sufre cambios dependiendo del ciclo estral, la gestación y el parto. Estos cambios suelen estar relacionados con variaciones en el flujo sanguíneo de la zona, estos vasos sanguíneos son altamente sensibles a los estrógenos, lo cual provoca, durante el periodo de estro la edematización de la vulva por ensanchamiento de estos vasos, que se observa un aumento de tamaño y la coloración roja característica del celo, el clítoris está compuesto de tejido eréctil cubierto de epitelio escamoso estratificado y con abundantes terminaciones nerviosas sensoriales, en la práctica durante la IA cervical, el clítoris es estimulado para aumentar las contracciones cervicales y evitar el reflujo espermático (Martínez *et al.*, 2015; Estrada-Paqui, 2017).

5.2 Técnicas de inseminación artificial en cerdas

La IA ha permitido al sector porcícola obtener mejores rendimientos y mejoras en los parámetros productivos y reproductivos, esta técnica consiste en depositar el semen procesado en el aparato reproductor de cerdas, con ayuda de pipetas comerciales desarrolladas para la disposición anatómica de la especie, algunos de los beneficios que se han obtenido mediante el uso de esta técnica son: un aumento de fertilidad comparado con la MN, mayor número de lechones por camada, así mismo el progreso genético, lo que le ha permitido al productor obtener mejores rendimientos en su producción (Knox, 2016). Se estima que de los 72 millones de cerdas presentes en el mundo, más de 25% son cubiertas mediante la IA (Hernández *et al.*, 2016) por lo que se ha buscado la optimización de la técnica y el uso eficiente de los verracos; un eyaculado promedio posee una concentración espermática de 70×10^9 millones de espermatozoides y para lograr una IA exitosa es necesario aproximadamente 6.5×10^9 espermatozoides, refiriendo así que de un eyaculado podrían ser inseminadas cerca de 10 a 11 (dando un doble servicio); sin embargo, para la producción porcina intensiva sería insuficiente, productiva y económicamente, motivo por el que se ha reducido el

número de espermatozoides, con el desarrollo de las nuevas técnicas, sin que los parámetros de fertilidad y prolificidad se vean afectados, son diversas técnicas de inseminación artificial y cada una utiliza diferentes tipos de sonda, de acuerdo al sitio donde se deposita la dosis seminal; pueden ser cervical, intrauterina, intrauterina profunda y laparoscópica (Bathgate *et al.*, 2008; Batalha *et al.*, 2009; Broekhuijse *et al.*, 2012, Fontana *et al.*, 2014).

5.2.1 Inseminación cervical o convencional (IAC)

Fue el primer método desarrollado por lo que su uso es tradicional, consiste en depositar el semen dentro del cérvix (**Fig.18**), mismo lugar de deposición cuando ocurre la MN, se depositan en torno a 2.5×10^9 a 3×10^9 espermatozoides en un volumen de 80-100 ml por dosis, se utiliza un catéter o pipeta que mide 54 cm, el cual es colocado en la parte proximal del cérvix, en general se han obtenido tasas de fertilidad cercanas a 85% y la prolificidad en las cerdas oscila entre 82.5%, en este mismo contexto, Cuevas *et al.*, (2005)

obtuvieron 85% de fertilidad en cerdas inseminadas con dosis de 100 mL utilizando la concentración espermática de 3×10^9 , así mismo el tamaño de camada fue de 11.45 lechones nacidos totales de la misma manera Luchetti *et al.*, (2016) compararon el uso de la IAC y post-cervical (IAPC), reportando que ambas técnicas resultaron similares en la tasa de fertilidad de cerdas inseminadas, en el mismo sentido Núñez-Torres *et al.*, (2017) evaluaron un nuevo método de inseminación llamado GEDIS comparado con la IAC, y no encontraron diferencia estadística en la tasa de fertilidad y prolificidad, solo la cantidad de reflujo seminal fue menor cuando se utilizó el método GEDIS, en el mismo sentido Hernández *et al.*, (2008) reportaron, mayor porcentaje de fertilidad utilizando la IAC (85%) comparado con la MN (77.5%) así como tamaños de camada de 11.4 y 10.7 lechones respectivamente. Por otro lado algunos autores reportan fertilidades menores a los establecidos mundialmente, Rogozarski *et al.*, (2013) obtuvieron

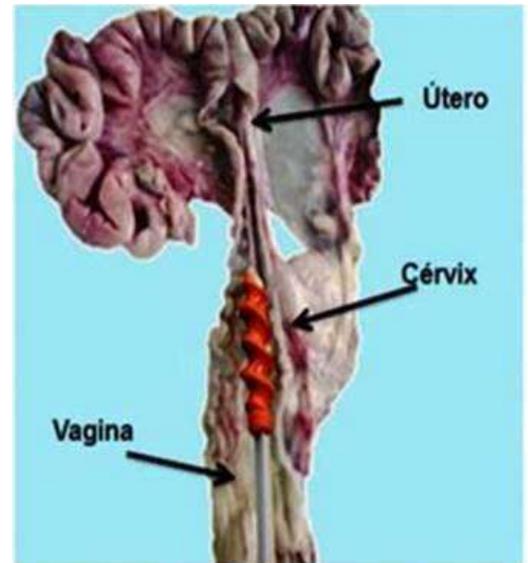


Figura 18. Inseminación cervical (IAC) en cerdas

porcentajes de fertilidad de 78% utilizando dosis seminales de 3×10^9 espermatozoides y un total de 10.14 lechones por camada, de la misma manera Hernández *et al.*, (2016) reportan 95% y 80% de fertilidad en las cerdas inseminadas con un servicio de MN y de IAC, por otra lado pese a los buenos resultados obtenidos con esta técnica ciertos inconvenientes se hacen presentes, como el de mantener concentraciones altas de espermatozoides en la dilución, además de que en la práctica es común la presencia de reflujo seminal por la disposición anatómica y fisiológica durante la aplicación (Hernández *et al.*, 2008; Broekhuijse *et al.*, 2012; Luchetti *et al.*, 2016; Torreta *et al.*, 2010). Actualmente esta técnica no es recomendable para su aplicación con semen criopreservado. (Knox, 2015; Yáñez, 2015; Knox, 2016; Quintero-Moreno *et al.*, 2016).

5.2.2 Inseminación post-cervical (IAPC)

Para maximizar el uso de las dosis seminales, fue necesaria la reducción en la concentración espermática, revolucionando la técnica de inseminación con la adaptación de una cánula interna al catéter convencional (75 cm totales) (Fig.19). Autores como Cuevas *et al.*, (2005) reportaron una mejor tasa de fertilidad (92%) mediante el uso de la IAPC, comparado con la IAC (85%), así mismo el tamaño de camada fue mayor en las cerdas inseminadas con la técnica post-cervical, de la misma manera, Hernández-Caravaca *et al.*, (2012) mencionan que no se encontró diferencia significativa en la tasa de fertilidad al disminuir la concentración espermática en 1×10^9 de espermatozoides en la IAPC de cerdas; sin embargo, el tamaño de camada fue inferior, concluyen que la dosis mínima para no afectar la producción de la granja es utilizar dosis de 1.5×10^9 de espermatozoides en dosis con volumen de 50-60 ml mediante la IAPC.

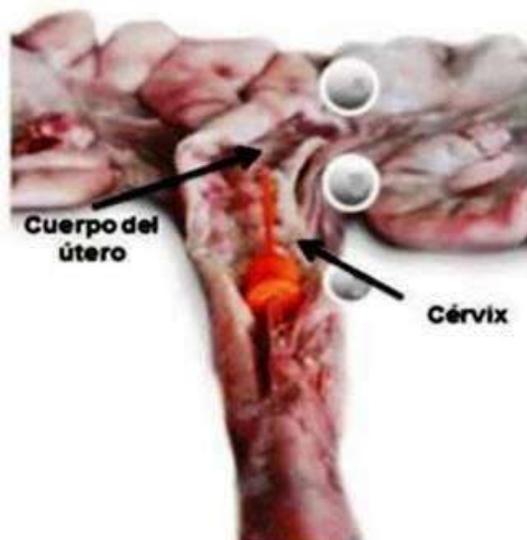


Figura 19. Inseminación Postcervical (IAPC) en cerdas

Roca *et al.*, (2016) obtuvieron una tasa de fertilidad de 82.72% mediante IAPC en concentraciones de 150×10^6 de espermatozoides, utilizando semen congelado-descongelado, mientras que Rogozarski *et al.*, (2013) obtuvo un aumento en la tasa de fertilidad (94.38%) al inseminar 84 cerdas mediante IAPC. Por el contrario, Hernández *et al.*, (2008) reportan fertilidad de 65.7% utilizando semen congelado-descongelado y la IAPC, con esta técnica se ha logrado la optimización en el uso del semen ya que además de reducir tanto el volumen y la concentración espermática por dosis, la pérdida por reflujo durante la aplicación ha sido eliminada (Hernández *et al.*, 2008; Cuevas *et al.*, 2005) sin embargo, varios autores mencionan que la desventaja que posee esta técnica de inseminación es el uso sobre cerdas primerizas, debido a su anatomía, las cerdas nulíparas presentan un canal cervical y uterino estrecho, por lo que la cánula podría lacerar el cuello uterino, esto implica mayor destreza para el inseminador (Luchetti *et al.*, 2016; Quintero-Moreno *et al.*, 2016).

5.2.3 Inseminación quirúrgica o intrauterina profunda (IAQ-DUI)

Esta técnica de inseminación permite depositar los espermatozoides, por vía quirúrgica o no quirúrgica (**Fig. 20**), en la profundidad de los cuernos uterinos, mediante la forma quirúrgica es necesario equipo de laparoscopia lo que eleva los costos de equipo; la forma no quirúrgica se lleva a cabo mediante un catéter modificado con una cánula que permite llegar al tercio superior del cuerno uterino (mide 148 cm aproximadamente) para depositar el semen, esta técnica ha logrado disminuir el volumen y la concentración por dosis, ya que se logra reducir hasta 20 veces el número de espermatozoides por dosis (0.15×10^9) en un volumen de 5 ml, sin que la fertilidad a parto y el tamaño de camada se vea afectado (Martínez *et al.*, 2001; De Alba, 2011). Al respecto, Bathgate *et al.*, (2008) corrobora que cuando se utiliza la técnica DUI se produce una hemorragia al lacerar las paredes del cuerno uterino, lo que podría aumentar el riesgo del daño hacia el tracto reproductivo en la cerda, Martínez *et al.*, (2001) realizó mediante endoscopia la inseminación de cerdas mediante DUI, comparadas con un grupo de cerdas inseminadas mediante IAPC, no se encontraron diferencias estadísticas entre

ambos grupos, concluyendo que es posible maximizar aún más las dosis seminales mediante DUI.

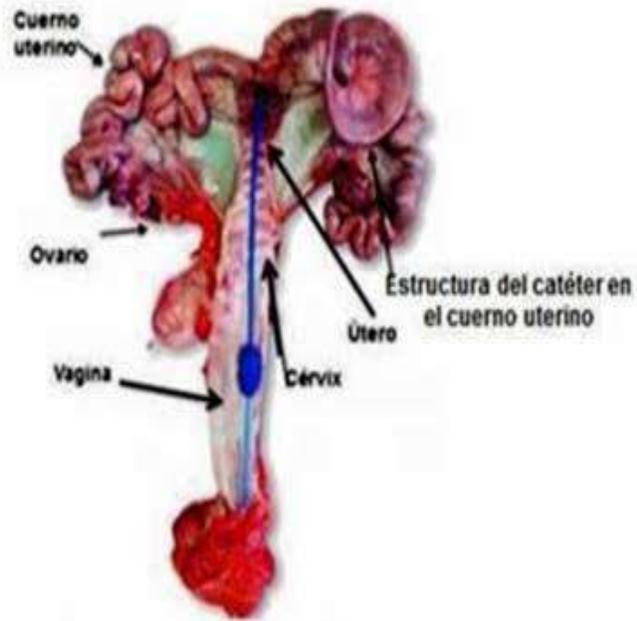


Figura 20. Inseminación artificial no quirúrgica (DUI) en cerdas

IV. HIPÓTESIS

El semen sometido a enfriamiento gradual a 5 °C mantendrá buena calidad y tendrá efecto positivo sobre la fertilidad y tamaño de camada en cerdas multíparas de manera similar al semen mantenido a 17 °C.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Estimar la calidad del semen a 5 °C, así como su efecto sobre la fertilidad y prolificidad de cerdas multíparas.

5.2 Específicos

- a) Evaluar la motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y tolerancia osmótica del espermatozoide sometido a enfriamiento de 5 °C.

- b) Determinar la fertilidad y tamaño de camada de cerdas multíparas inseminadas con semen a 5 °C.

VI. MATERIALY MÉTODOS

6.1 Área de estudio

En un primer periodo se realizó la evaluación y procesamiento del semen

actividad que se llevó a cabo en el laboratorio de reproducción porcina de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia N° 1 de la UAGro (Fig. 21). En la región Tierra Caliente del Estado de Guerrero, México. La cual cuenta con un clima seco cálido, con temperatura mínima de 34 °C y como máxima arriba de los 40 °C, una precipitación promedio de 600 mm anuales y la humedad relativa inferior a 25% y máxima hasta un 50%. (INEGI, 2017).



Figura 21. Localización del área de estudio; Evaluación de calidad seminal

El segundo Periodo (fase de campo) se llevó a cabo en la granja porcícola “Las Colmenas” ubicada en la región centro del estado de Guerrero, situada en el Municipio de Tepecoacuilco de Trujano. El clima es subhúmedo-cálido con temperaturas que oscilan de 24.8 °C a 31.5 °C. (INEGI, 2017).



Figura 22. Granja porcícola “Las colmenas”; Tepecoacuilco de Trujano, Gro.

6.2 Diseño experimental

Primer periodo de estudio: se utilizaron cuatro verracos de línea comercial Pietrain/Duroc/Yorkshire sexualmente maduros entre 18 y 24 meses de edad alojados en corrales individuales 10 m² y alimentados con 2 kg/día de concentrado comercial con 14% de proteína y 3.1 Mcal de energía, así como agua a libre acceso, negativos a enfermedades como el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) y Circovirus, son vacunados a intervalos de 6 meses contra; parvovirus, leptospirosis y erisipela.

6.2.1 Colección de semen

El eyaculado se obtuvo por el método de la mano enguantada de acuerdo a técnica descrita por Estrada *et al.*, (2014) colectándose la fracción rica en espermatozoides y diluida *in situ* 1:1 en el extensor comercial Mill®[®], de media conservación a base glucosa, citrato de sodio, bicarbonato, EDTA y antibiótico.

6.2.2 Analítica seminal

Los eyaculados fueron evaluados de forma macroscópica (volumen y temperatura) y microscópicamente (motilidad general, concentración espermática / ml por eyaculado, morfología anormal). (**Cuadro 1**)

Cuadro 1. Valores de referencia procedentes de los eyaculados de los verracos colectados en condiciones del trópico de Guerrero, México (n=60)

Estimador seminal	Media y error estándar
Temperatura ambiental (°C)	30.9 ± 0.4
Volumen de la fracción rica (mL)	145 ± 5.8
Concentración/ mL	1057 x10 ⁶
Morfología anormal (%)	5 ± 0.3
Motilidad general (%)	70 ± 1.8
Viabilidad (%)	89.9 ± 0.5

6.2.3 Procesamiento del semen a 5 °C

Posterior a la evaluación, el semen diluido se conservó (1:1) por 24 horas a 17 °C, en cámara con temperatura controlada y posteriormente se sometió al proceso de centrifugación a 2400 rpm x 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó el medio de enfriamiento LEY (a base de lactosa 248 mM, Kanamicina 0.8 g/L y yema de huevo 20%), se procedió al enfriamiento progresivo durante 120 minutos hasta alcanzar los 5 °C (la tasa de enfriamiento fue de 0.11 °C x minuto) (Estrada *et al.*, 2014).

6.2.4 Parámetros Seminales evaluados del semen a 5 °C

Se utilizaron 60 eyaculados provenientes de los 4 verracos y se determinaron 2 evaluaciones seminales, la primera cuando el semen alcanzó los 5° C (hora cero) y la segunda evaluación a las 24 horas de conservación a esta misma temperatura (hora 24). Para los dos casos se tomó un muestra seminal en eppendorf con 500 µl de semen diluido y 1500 µl del medio comercial MIII® y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos para proceder a evaluar la motilidad progresiva, la viabilidad, la integridad de acrosoma y la tolerancia osmótica, los cuales se evaluaron en base a los siguientes protocolos:

6.2.4.1. Motilidad general

Se analizó de acuerdo a la técnica adaptada por Estrada *et al.*, (2014) en la cual se agregan 10µL de semen en un portaobjetos y se colocaba un cubreobjetos (ambos atemperados) y se observaba en el microscopio con el objetivo 10x y el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con movimiento individual.

6.2.4.2. Viabilidad espermática

Se colocaron 10 µL de semen a 5 °C en porta objetos y fueron mezclados con 10 µL de la tinción vital de eosina-nigrosina, se hizo el frotis convencional y se evaluó al microscopio, expresando el resultado en porcentaje. Los espermatozoides muertos se tiñen intensamente y los vivos presentaban un color

tenue debido a la integridad completa de la membrana citoplasmática (Bonet *et al.*, 2006).

6.2.4.3. Ensayo dual de resistencia osmótica (HOST) / integridad acrosomal (Azul de comassie)

De acuerdo a la técnica adaptada por Estrada *et al.*, (2014) se colocan 50 μ L del eyaculado en un medio hipotónico (120-150 mOsm), 400 μ L incubado a 37 °C a por 30 minutos. Posteriormente se tomaban 10 μ L de la muestra y se colocaba en un portaobjetos, para hacer el extendido convencional, el cual fue inmerso en formaldehído al 4% durante 15 minutos; se retiraba el frotis ya fijado para proceder a ser inmerso en la tinción azul de Comassie al 0.22 % durante 3 minutos. El frotis se observó en un microscopio bajo objetivo de inmersión (100x). En la valoración los espermatozoides con membrana funcional, buscan controlar su osmolaridad y al estar en un medio hiposmótico reaccionan enrollando el flagelo, los espermatozoides con flagelo enrollado, son considerados viables y funcionales. La tinción de azul de Coomassie es una tinción con afinidad por las proteínas, por lo cual las proteínas acrosomales toman una coloración azul muy intensa favoreciendo la valoración de la integridad. Se contaron 200 espermatozoides y el resultado se expresó en porcentaje para la evaluación de la integridad del acrosoma y la tolerancia osmótica.

6.3 Segundo periodo de estudio: Evaluación de la fertilidad y prolificidad

Se utilizaron 84 cerdas multíparas (de 2 y 3 partos) de línea comercial Yorkshire/Landrace, de una granja de sitio 1 de producción (**Fig.23**). Las reproductoras fueron alojadas en jaulas individuales en el área de servicio y gestación, recibieron alimento comercial de tipo reproductor con 14% de PC y 2.8 Mcal de energía metabolizable, y agua a libre acceso, se llevó a cabo un programa de vacunación preventivo triple a base parvovirus, leptospirosis y erisipela, adicionalmente se realizaron estudios serológicos cada 6 meses para el monitoreo de PRRS. La lactancia fue de 22 días y la condición corporal de salida de las cerdas fue de 3 (en una escala de 1-5).



Figura 23. Grupos de cerdas inseminadas mediante IAPC con semen a 5 °C

Se formaron 2 grupos de cerdas: para el **grupo 1** se tomaron en cuenta los registros de 42 cerdas inseminadas con semen diluido a 17 °C (Control de granja) y para el **grupo 2** se inseminó a 42 cerdas con semen refrigerado a 5°C. En ambos grupos se utilizó la técnica de IA post-cervical con 3000×10^6 espermatozoides viables de los mismos verracos, en un volumen de 60 mL en el medio comercial Mill®. El protocolo de IA se llevó a cabo con el siguiente programa: a partir del día siguiente del destete se procedió a la detección del estro en presencia de verraco recelador por la mañana y tarde, una vez confirmando el estro estático por el reflejo de inmovilidad, se procedió a realizar la primera Inseminación a las 24 horas de la detección del estro y la segunda inseminación 12 horas posteriores. La fertilidad de las cerdas inseminadas se determinó mediante la observación de no retorno a estro a los 21 días post-inseminación mediante verraco recelador y la confirmación de la gestación se hizo mediante ultrasonografía abdominal (Aloka®, Pro Sound 7.5 MHz) a los 42 días posterior a la fecha de IA. Para la valoración de la prolificidad a parto, se llevó a cabo el registro del tamaño de camada al nacimiento (lechones nacidos totales, lechones nacidos vivos y lechones nacidos muertos).

6.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la analítica seminal (motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y tolerancia osmótica) fueron sometidos al análisis de varianza mediante la prueba de T, para la diferencia de medias y la prueba de Levene para la igualdad de varianzas, considerando los tiempos de evaluación (hora 0 y hora 24) así mismo los datos obtenidos de la prolificidad de las cerdas (lechones nacidos totales, nacidos vivos y muertos) considerando la temperatura de conservación del semen (17 °C y 5 °C) como variables independientes, mientras que los datos de fertilidad de cada grupo de conservación de semen se evaluó mediante la prueba de χ^2 de Pearson. El valor de significancia fue $P < 0.05$ mediante el programa SPSS V20 (2011).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de los parámetros de calidad seminal las características de motilidad total, concentración, viabilidad, integridad del acrosoma y resistencia osmótica son indicadores importantes que ayudan a predecir la capacidad del espermatozoide en la fecundación del ovocito, la calidad espermática obtenida en el presente estudio (**Cuadro 2**), se observó que la motilidad, integridad acrosomal y tolerancia osmótica no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) a 5 °C ya sea a la hora 0 y 24 horas, mientras la viabilidad espermática fue mejor ($91.30\pm 0.18\%$) a la hora 24 de evaluación ($P<0.05$).

Cuadro 2. Evaluación de la calidad espermática a 5 °C del semen de verraco (media y error estándar, n=60)

Evaluación seminal	Motilidad	Viabilidad	Integridad acrosomal	Tolerancia osmótica
Hora 0	72 ± 0.44^a	89.46 ± 0.18^a	66.03 ± 0.13^a	76.90 ± 0.14^a
Hora 24	75 ± 0.44^a	91.30 ± 0.18^b	66.58 ± 0.13^a	72.81 ± 0.14^a

Diferente literal en la misma columna indica efecto significativo ($P<0.05$)

Hora 0: evaluación del semen a 5 °C del proceso de enfriamiento.

Hora 24: evaluación seminal a las 24 horas de almacenamiento a 5 °C.

La motilidad espermática está estrechamente relacionada con la tasa de parto y el tamaño de camada, la motilidad obtenida de este estudio represento el 75% a la hora 24 de almacenamiento a 5 °C, valores superiores fueron reportados por Grossfeld *et al.*, (2016) quienes obtuvieron 84% de motilidad progresiva, utilizando diluyente libre de antibióticos almacenado a 5 °C, por otra parte, Namula *et al.*, (2013) obtuvieron 45% y 60% de motilidad utilizando 7.5 mg/mL y 15 mg/mL de leche descremada como extensor en el enfriamiento a 5 °C de semen de verraco. Es posible que las variaciones entre los resultados sobre motilidad, describan la capacidad de estabilidad que la membrana espermática adquiere ante los cambios de temperatura inducidos y la acción coadyuvante de la yema de huevo y lactosa como extensores no penetrantes. Adicionalmente

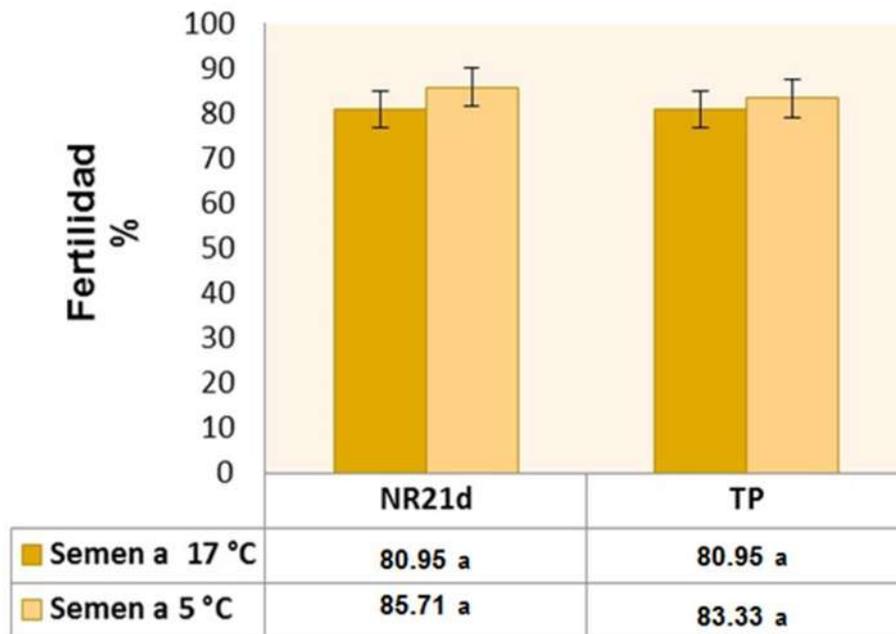
Casas, (2013), Nguyen *et al.*, (2016) mencionan que los espermatozoides de verraco almacenados a 5 °C, su metabolismo disminuye paulatinamente las actividades metabólicas sobre todo en la concentración de ATP y ADP, esto le permite conservar su funcionalidad durante más tiempo que cuando se almacena a temperaturas mayores. También Malo *et al.*, (2010) indican que el uso de extensores y crioprotectores adecuados, así como el proceso de enfriamiento son factores importantes para lograr la conservación seminal por los efectos benéficos que los azúcares presentes en el extensor ayudan en la motilidad y viabilidad espermática durante la IA y de la misma manera el enfriamiento a 5°C, además se ha demostrado que las bacterias se inhiben durante el almacenamiento de 5 °C (Pagl *et al.*, 2006; Casas y Althouse, 2013; Santos *et al.*, 2016; Luther *et al.*, 2018).

Por otro lado, la viabilidad espermática obtenida para el presente trabajo a la hora 24 de evaluación fue de 91.30 ± 0.18 %, valores diferentes han encontrado Namula *et al.*, (2013) durante 1 semana de evaluación con el 70% de viabilidad cuando utilizaron 15 mg/mL de leche descremada como extensor. En esta tendencia Grossfeld *et al.*, (2016) refieren que el daño acrosomal en el almacenamiento a 5 °C mediante el diluyente Androstar 5, no mostro diferencia comparado con el diluyente Androstar Premium (almacenado a 17°C), la capacidad estructural que adquiere la membrana plasmática en su proceso de adaptación a los cambios que indujeron la transición de fases, le brinda una respuesta adecuada al desarrollo funcional de la misma, a la vez se correlaciona como indicativo de la capacidad fecundante del espermatozoide. No obstante Medina *et al.*, (2008), mencionan que tanto la motilidad y la viabilidad pueden ser modificados por factores como las proteínas del plasma seminal asociadas a la producción de energía mitocondrial, la producción de óxido nítrico y las fosforilación de las proteínas, así mismo la fluidez de la membrana tiene un papel importante en los cambios espermáticos ya que las especies con mayor contenido de colesterol en la membrana del espermatozoide son menos susceptibles a los daños causados por las bajas temperaturas como en el caso del espermatozoide de rumiantes y caninos.

Aunque los ensayos de evaluación tradicionales de motilidad y viabilidad para la evaluación de la calidad seminal son indicadores de la estructura celular del espermatozoide, no obstante es de suma importancia el predecir con mayor certeza la habilidad fecundante del espermatozoide de verraco, esto es posible mediante la prueba hiposmótica (HOST) que permite evaluar la integridad de la membrana celular, la cual es capaz de controlar cambios del volumen celular a fin de ajustar las concentraciones iónicas intracelulares cuando se encuentra bioquímicamente intacta, su importancia se deriva al estar íntimamente relacionada en el proceso de capacitación, reacción acrosomal y libida fecundación, se ha aplicado con éxito en eyaculados de humanos, bovinos, ovinos, y actualmente en cerdos, con protocolos específicos para cada especie (Bedoya *et al.*, 2003; Osorio-Serna *et al.*, 2007; Bonet *et al.*, 2009; Quispe *et al.*, 2015; Sánchez y Zamora 2016). En el presente trabajo se observó que la integridad del acrosoma y tolerancia osmótica del flagelo durante el enfriamiento a 5 °C a la Hora cero y Hora 24 de almacenamiento no mostraron diferencias significativas, lo que indica que el semen es funcional y tiene la capacidad de fecundación a esta temperatura de enfriamiento. Por lo que se ha postulado que la prueba HOST resulta fundamental como herramienta clínica en la predicción de la calidad funcional del espermatozoide y que su aplicación se relacione con la motilidad y viabilidad, en este sentido Sánchez y Zamora (2016) mencionan que el enrollamiento del flagelo indica el funcionamiento de la membrana. Osorio-Serna *et al.*, (2007) reportan en semen fresco a 17 °C de verracos de línea materna el 95.8% y en línea paterna 94.1% integridad del acrosoma y asociados positivamente con la fertilidad de la hembra. Sin embargo en muestras de semen congelado-descongelado de verracos Hernández *et al.*, (2015). Obtuvieron 37.27% en la prueba HOST/Eosina-nigrosina y por consecuencia bajas tasas de fertilidad al usar el semen congelado/ descongelado.

La eficiencia reproductiva usualmente se evalúa a través de la fertilidad y la prolificidad de la cerda, mediante, ambos parámetros se involucra directamente la rentabilidad de la granja; los resultados en el presente trabajo en la tasa de fertilidad obtenidos entre las cerdas multíparas inseminadas con semen a 5 °C (**Gráfica 1**) son notables representando el 85.71 %, comparado con el 80.95 % con semen a 17 °C (control de granja) sin embargo no es significativo ($P>0.05$) entre ambos grupos.

Gráfica 1. Fertilidad de cerdas multíparas inseminadas con semen a 17 °C y 5 °C mediante la técnica post-cervical en el trópico de Guerrero, México (n=84)



Literales iguales en la misma columna indican $P>0.05$

NR₂₁: no retorno a estro a 21 días

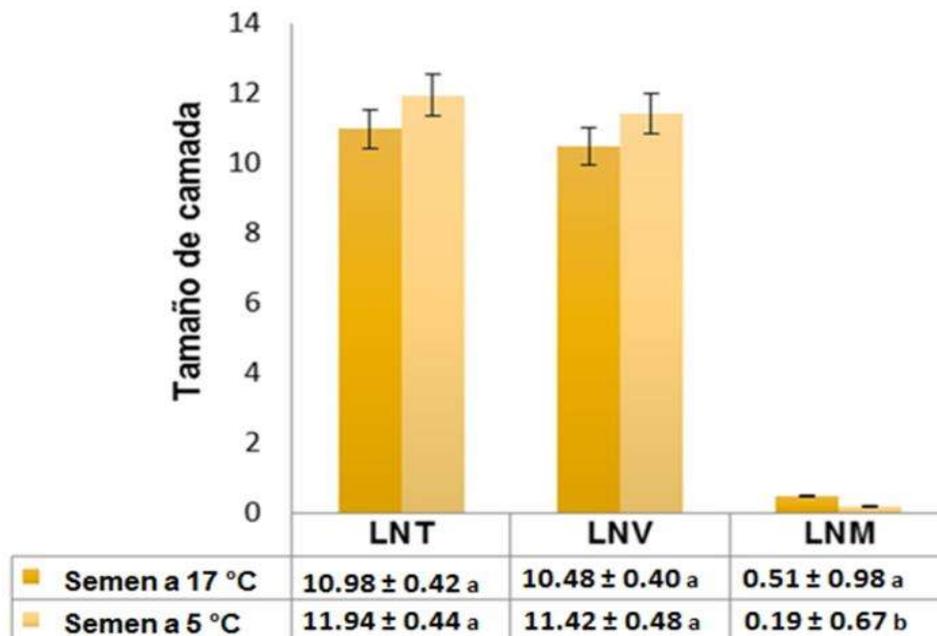
TP₁₁₅: Tasa de parto a 115 días

La fertilidad a no retorno al celo a siguiente ciclo estral implica en primera instancia que ha habido concepción del ovocito y preimplantación del embrión. En este contexto Llanes-Chalé *et al.*, (2007) mencionan que la tasa de gestación a nivel granja oscila entre 89% y 92% mediante la IA convencional con semen fresco diluido a 17 °C, no obstante hasta el momento los reportes del uso del semen a 5 °C son limitados, tan solo son reseñables los reportados por Namula *et al.*,

(2013) quienes obtuvieron el 50% de fertilidad a no repetición en las cerdas inseminadas a 5 °C. En los valores de fertilidad a parto encontrados en el presente trabajo tampoco se observó diferencia significativa ($P>0.05$) entre cerdas inseminadas con semen a 17°C y a 5°C (**Gráfica 1**), los resultados de fertilidad a parto son muy aceptables para cerdas inseminadas con semen a 5 °C, no obstante valores superiores obtuvo Grossfeld *et al.*,(2016) quienes señalan tasa de fertilidad a parto del 90% en las cerdas inseminadas con semen diluido y almacenado a 5 °C en condiciones de clima templado y no bajo condiciones de trópico.

El tamaño de camada, es un parámetro que permite evaluar el desempeño reproductivo de la hembra, los resultados del tamaño de camada en el presente estudio muestran que las cerdas multíparas inseminadas con semen a 17 °C y 5 °C no mostraron diferencia significativa ($P>0.05$), en las variables de lechones nacidos totales y lechones nacidos vivos (10.98 ± 0.42 , 10.48 ± 0.44 y 11.94 ± 0.40 , 11.42 ± 0.48 respectivamente. (**Gráfica 2**).

Gráfica 2. Tamaño de camada de cerdas multíparas inseminadas con semen a 17°C y a 5°C en condiciones de trópico de Guerrero, México (Media y error estándar, n=78)



Diferente literal en la misma columna indica efecto significativo $P<0.05$

LNT: Lechones nacidos totales

LNV: Lechones nacidos vivos

LNM: Lechones nacidos muertos

En base a esta tendencia en el tamaño de camada al nacimiento, el uso del semen a 5 °C puede ser utilizado para programas de IA en granjas comerciales. En lo que respecta a los lechones nacidos muertos fue ligeramente mayor ($P < 0.05$) cuando las cerdas fueron inseminadas con semen a 17 °C que a 5 °C. en este contexto algunos factores pueden influir sobre la mortalidad del lechón no atribuibles al semen, por lo que Segura *et al.*, (2007) mencionan que cerca del 70% de la mortalidad de lechones al nacimiento, se asocia a patologías propias del útero gestante, aspectos ambientales, genéticos y propios del manejo durante el parto, también Salazar-Villanea, (2018) refiere que la duración del parto y la fase expulsiva entre los lechones, dispone la incidencia de hipoxia de los mismos, interrumpiéndose la respiración del lechón y como subsecuente la muerte del mismo, por otra parte, Segura *et al.* (2007), Llanés-Chale (2007); Martín-Hidalgo, (2013) y Salazar-Villanea, (2018) mencionan que factores como mayor grosor de grasa dorsal afectan la cantidad de esteroides liposolubles a estrógenos, lo que incurre sobre la inactivación de receptores de oxitocina, así mismo el nivel de constipación de las cerdas que no fueron alimentadas con cantidades de fibra adecuada, inducen la liberación de endotoxinas al torrente sanguíneo, interfiriendo en el sistema endocrino y por consiguiente aumenta la duración del parto.

VIII. CONCLUSIONES

- El enfriamiento y almacenamiento del semen de verraco a 5 °C de 0 a 24 horas, no afecta los parámetros de motilidad, tolerancia osmótica e integridad acrosomal y mejora la viabilidad del espermatozoide de verraco.
- La Fertilidad a no repetición a 21 días y a parto 115 días así como la prolificidad determinada por los lechones nacidos totales y nacidos vivos no fueron significativas entre las cerdas multíparas inseminadas con semen a 5 °C y a 17 °C.
- De manera conjunta es notable mencionar el uso del semen a 5 °C en la IA de cerdas multíparas significó una ventaja para el transporte a largas distancias mediante el uso de una hielera convencional.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, el uso de semen a 5 °C es una alternativa que por sí sola o conjuntamente con aplicación de semen a 17 °C puede ser usado en los programas reproductivos de granjas porcinas comerciales en condiciones de trópico.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alemán D., Alfaro M., Hurtado, E. (2006). Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas. *Idesia (Arica)*, 24(3), 33-37
2. Andrabi S.M.H, Ahmad N., Abbas A. y Anzar M. (2001). Effect of two diferente antibiotic combintions on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. *Pakistan Veterinarian Journal* 21(4). 166-169.
3. Audet I., Laforest, J.-P., Martineau, G. P., & Matte, J. J. (2004). Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars¹². *Journal of Animal Science*, 82(2), 626–633.
4. Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 65–75.
5. Aurich, C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 268–275.
6. Bailey L.J., Lessard, C., Jacques J., Breque C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino H.H. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70: 1251–1259
7. Baishya S.K., Biswas R.K., Kadirvel G., Deka B.C., Suresh K., Ngachan S.V. (2016). First report on in vivo fertility trial of frozen thawed boar semen in India. *Indian Journal Animal Research*. 50 (2): 181-184
8. Barbas J.P., Mascarenhas R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10:49–62
9. Batalha A. É., Paulino C. E., Assis C. A. H., Guiselli L. F., Guerino M. G. y Rêgo P. T.A. (2009). Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38(8), 1460-1467.
10. Bathgate, R., Eriksson, B. M., Thomson, P. C., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2008). Field fertility of frozen-thawed boar sperm at low doses using non-

- surgical, deep uterine insemination. *Animal Reproduction Science*, 103(3-4), 323–335.
11. Batista R., Ceiro, F., Grimon, M., Legrá, D., Aguilera, I., Brea, O., Neira, S. (2007). Evaluación del Porciento de fertilidad en sementales con uso de semen porcino refrigerado en la granja Integral Palmas Altas. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VIII (6), 1-4.
 12. Bobadilla S.E.E., Espinoza O. A, y Martínez C.A. F. E. (2013). Swine piglet breeding farms competitiveness and profitability. *Ciencias Pecuarias*, 4(1), 87-92.
 13. Bonet S., Dolores E., Pinart S., Sancho E., Yeste M. Casas I., García E., Fábrega A., Torner E. (2006). Biotecnología de la Reproducción Porcina: Estado actual y futuro de las técnicas de análisis seminal. *Techno Sperm*. 11: 18-23.
 14. Broekhuijse M. L.W.J., Gadella B. M., Šostarić E. and Feitsma H. (2011). Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*, 76(8) 1473-1486.
 15. Broekhuijse M.L.W.J., Feitsma H. y Gadella B.M. (2012). Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. *Veterinary Quarterly*, 32:3-4, 151-157.
 16. Cardona-Maya W., Berdugo J. y Cadavid A. (2008). Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urológicas Españolas*. 32 (4), 443-445.
 17. Carpio C., M., Cadillo C., J., Mellisho S., E. (2008). Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *RIVEP*, 19 (1), 15-19.

18. Casas I., and Althouse, G. C. (2013). The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 °C. *Cryobiology*, 66(1), 69–75.
19. Contri A., De Amicis I., Molinari A., Faustini M., Gramenzi A., Robbe, D. and Carluccio A. (2011). Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, 75(7), 1319–1326.
20. Córdova I. A., Pérez G. J.F., Méndez H. W., Villa M.A.E. & Huerta C.R. Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. (2015). *Revista Veterinaria* 26 (1): 69-74.
21. Córdova I. A., Córdova J.S.M., Córdova J.A., Pérez G.J., Martín R.S. (2005). Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides. *Ciencia Ergo Sum*, 12 (3). 271-274,
22. Cuenca C. M. y Avellaneda C. J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *REDVET* .Revista Electrónica de Veterinaria 18(9).
23. Cuevas P., Pedroza C., y Jiménez C. (2005). Evaluación de la técnica de inseminación artificial postcervical y su relación con los parámetros reproductivos. *Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 52 (II), 144-155.
24. De Alba, C. (2011). La inseminación intrauterina en cerdos: beneficios y riesgos. *Minitub Ibérica* S.L. Tarragona, España. Disponible en <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4348202>.
25. De Jesús A., Rueda M. y Perdigón R. (2008). Comparación de dos técnicas en la determinación de morfoanomalías del semen porcino. *Rev. Unell. Cienc. Tec.* 25. 32-39.
26. De Mercado E. (2011). Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico. Memoria para

optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. *Facultad de veterinaria*. Departamento de medicina y cirugía animal 1.

27. Del Valle R. A. (2017). Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos utilizados en la monta natural. *Revista Electrónica de Veterinaria, REDVET* 18 (10), 1-17.
28. Díaz O., Mesa H., Gómez G., Henao F. J. (2009). Evaluación in vitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. *Revista Veterinaria y Zootecnia*. 3 (1): 32-37.
29. Estrada P. E., Rodríguez G.J. E., Rocha L.G., Balasch S., Bonet S., and Yeste M. (2014). Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione, increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*. 2: 88–99.
30. Estrada-Paqui y Martínez R. (2017). Tendencias actuales de reproducción en porcino, reproducción e inseminación artificial. *Editorial Académica Española*.
31. Faustini M., Torre M. L., Stacchezzini S., Norberti R., Consiglio A. L., Porcelli F. y Vigo D. (2004). Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18 °C. *Theriogenology*, 61(1), 173–184.
32. Flores C., Meléndez C., Mendoza C., Márquez Y., y Vilanova, L.T. (2018). Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Revista Veterinaria*, 29(1), 13-17.
33. Fontana D.L., Ulguima R.R., Sbardellaa P.E, Bernardib M.L., Wentza I. y Bortolozzo F.P. (2014). Fixed-time post-cervical artificial insemination in sows receiving porcine luteinising hormone at oestrus onset. *Animal Reproduction Science* 144, 109– 114.

34. Foote R.H. (2002). Within herd use of boar semen at 5 degrees C, with a note on electronic monitoring of oestrus. *Reproduction Domestic Animal*. 37(1): 61-73.
35. Fraser L. and Strzezek J. (2004). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 1:42.
36. Frydrychová S., Lustyková A., Václavková E., Lipenský J., Rozkot M. (2015). Effect of different extenders on quality of frozen thawed boar semen. *Indian Journal Animal Research*. 49 (6) 851-854
37. Fuentes C.M., Pérez G.L., Suárez H.Y., Soca P.M. (2006). Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales. *REDVET*. 7(1): 123-135
38. Gadea J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro (Revisión). *Investigación Agropecuaria, Prod. Sanid. Anim.* 16 (1), 63-77.
39. Gadea J., Ruiz S., Sellés E. y Marco Ma. (2003). Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino. *ITEA Vol. Extra* 24 (1). 330-332
40. Galina C. y Valencia J. (2009). Reproducción de animales domésticos. 3° edición; *Limusa*; México DF.
41. García R. Ma. G., Navarrete R.W. (2017). Efecto de la línea genética en el proceso de criopreservación sobre la membrana plasmática, acrosoma y resistencia osmótica del espermatozoide porcino. Tesis de licenciatura. *Facultad de medicina veterinaria y zootecnia*. Universidad Autónoma de Guerrero.
42. Gil J., Tortades J.M., Alevia A. (2002). Post cervical insemination use of different volumes and sperm number. *Proceedings 17th IPVS Congress*. June 2-5; Ames, Iowa USA. 2002- 229.

43. Gómez-Coronado C. Ma. T. (2018). Tesis de grado; estudio de nuevos métodos de conservación seminal en el verraco. *Facultad de Veterinaria* Departamento de Fisiología Animal. CACERES, Universidad de Extremadura.
44. González L.O., Fischman M.L., Boquet M., Acerbo M.C., Miguez M.S., Cisale H.O., y Ferrari M.R. (2013). Técnicas complementarias para la evaluación de semen porcino. *InVet*, 15(1), 37-46.
45. Green C. E. and Watson P.F. (2001). Comparison of the capacitation like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122 (2): 889–98.
46. Grobfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M.C., D. Rath (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70. 1225 -1233
47. Grossfeld, R., Peralta, W., Weitze, K.-F., & Waberski, D. (2016). Antibiotic-free hypothermic storage of boar semen in Androstar +5 extender results in similar fertility results compared to semen stored at 17°C in extender with antibiotic content. *Animal Reproduction Science*, 169, 125.
48. Guimarães D.B., Barros T. B., Van Tilburg M. F., Martins A.M J., Moura A. A., Moreno B.F., Monteiro-Moreira A. C, Moreira A. R., Toniolli R. (2017). Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation, *Animal Reproduction Science*, 183, 27-38.
49. Hafez E. S. E. (2006) Reproducción e inseminación artificial. *Mc Graw Hill Interamericana*; 7^a. México
50. Henao G., Trujillo E., Buriticá M., Sierra C., Correa G. y González O. (2004). Efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 57(2), 2355-2371.

51. Hernández J. y Alemán R. (2008). Efecto de la época del año en algunas características del eyaculado de diferentes genotipos porcinos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, IX (12), 1-12.
52. Hernández M., Bolarín A., Gil M.A. Almiñana C., Cuello C., Parrilla I., García E., Caballero I., Sánchez O.J., Lucas X., Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J. (2006). Criopreservación Espermática. *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universidad de Girona. 1 (1): 185-200.
53. Hernández P.J.E., Fernández R.F, Mejía R.A.I. (2008). Efecto de la monta natural y el uso de diferentes tipos de semen sobre la productividad de la cerda. *Revista de Salud Animal*, 30(2), 98-102
54. Hernández-Caravaca, I., Izquierdo-Rico, M. J., Matás, C., Carvajal, J. A., Vieira, L., Abril, D., García-Vázquez, F. A. (2012). Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Animal Reproduction Science*, 136(1-2), 14–22.
55. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017).
56. Kaneto M., Harayama H., Miyake M., Kato, S. (2002). Capacitation like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine phosphorylated sperm proteins. *Animal of Reproduction Science*, 73 (1):197-209.
57. Knecht D., Jankowska-Mąkosza A. y Duziński K. (2017). The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of al boars productivity. *Livestock Science*, 201.
58. Knox R. V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83–93.
59. Knox R.V. (2015). Review Article: The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animal*. 50 (2), 90–97.

60. Kubus (2010). Manual de inseminación artificial porcina. *Kubus* . Madrid España.
61. Llanes-Chalé J E, Alzina Lopez A, Segura Correa J C, Álvarez Fleites M J y Góngora Castro G 2007: Porcentaje de gestación y prolificidad de cerdas en el trópico utilizando las técnicas de inseminación artificial convencional e intrauterina. *Livestock Research for Rural Development*. 19(145).
62. López R. A., Soom A., Arsenakis I. y Maes D. (2017). Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management*. 3(15).
63. Luchetti G. C., Renoulin G. E. y Lombardo M. D. (2016). Comparación entre inseminación artificial cervical y post-cervical porcina en nulíparas y multíparas. *SPERMOVA*. 6(2),119-122.
64. Luther A., Le Thi, X., Schäfer, J., Schulze, M., y Waberski, D. (2018). La irradiación de dosis de semen con luz roja basada en LED en una cámara fotográfica no mejora la calidad in vitro de los espermatozoides de jabalí estresados térmicamente. *Reproducción en Animales Domésticos*, 53 (4), 1016-1019.
65. Malo C., Gil, L., González, N., Cano, R., de Blas, I., and Espinosa, E. (2010). Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*, 61(1), 17–21. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.03.008
66. Maroto-Martín L. O., Muñoz E. C., De Cupere F., Van Driessche E., Echemendia-Blanco D., Rodríguez J. M. M., and Beeckmans S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), 95–104.
67. Martínez E., Vázquez, J., Roca J., Lucas X., Gil M., Parrilla I., Day B. (2001). Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction*, 122(2), 289–296.

68. Martínez G. R., Gamba A. J., Contreras O., Trujillo Ma. E. Ortega, Hernández T. E, Olmos H. S.A., Roldán S. P., Ramírez N. R., Bolaños L. D. J., Moles C. L.P., (2015). La Cerda reproductora. Primera Edición, *Universidad Nacional Autónoma de México*. Ciudad Universitaria.
69. Martínez-Castañeda F.E. y Perea-Peña M. (2012). Estrategias locales y de gestión para la porcicultura doméstica en localidades periurbanas del valle de México. *Revista Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 9 (4), 411-425.
70. Mayorga-Torres B. J. M., Cardona-Maya, W., Cadavid, Á., & Camargo, M. (2013). Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urológicas Españolas*, 37(4), 221–227.
71. Medina R. V. M., Pérez D., B.A. y Cruz C. P. E. (2008). Efecto de la incubación postdescongelación sobre la calidad de espermatozoides criopreservados de cerdo. *Orinoquia*, 12(2), 149-161.
72. Namula Z., Sato Y., Kodama R., Morinaga K., Luu V.V. Taniguchi M., Nakai M., Tanihara F., Kikuchi K., Nagai t., Otoi t. (2013). Motility and fertility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks., *Animal Science Journal* 84. 600 – 606
73. Nguyen Q. T., Wallner U., Schmicke M., Waberski D., and Henning, H. (2016). Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction. *Biology Open*, 5(11), 1743–1751.
74. Noguchi M., Yoshioka K., Hikono, H., Suzuki C., and Kikuchi, K. (2015). Effect of semen extenders on frozen-thawed boar sperm characteristics and distribution in the female genital tract after deep intrauterine insemination in sows. *Animal Reproduction Science*, 163, 164–171.
75. Núñez-Torres O.P., Montero-Recalde M. A., Rosero-Peñaherrera M.A., Lozada-Salcedo E. Ef., y Pazmiño-Miranda P. (2017). Evaluación comparativa de los parámetros reproductivos entre el método de auto

- inseminación cervical GEDIS y el tradicional en cerdas multíparas. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(1), 72-81.
76. Obando P., Alfaro M., Hurtado E. y Rodríguez T. (2012). Respuesta reproductiva de cerdas multíparas a la adición de oxitocina y prostaglandina F2 alfa previo a la inseminación artificial. *Zootecnia Tropical*. 30(2), 169-174.
77. Oberlender G., Murgas L., Zangeronimo M., Silva A., Pereira L. y Muzzi R. (2012). Comparación de dos diferentes metodologías de evaluación de la morfología del semen porcino. *Archivos de Medicina Veterinaria* 44(2):201-205.
78. Okazaki T., and Shimada, M. (2012). New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Animal Science Journal*, 83(9), 623–629.
79. Osorio S.R.E., Giraldo J.F., Mesa H., Gómez L.G., Henao U.F.J. (2007). Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco. *Veterinaria y Zootecnia*. 1(1): 41-47.
80. Pagl R., Aurich J. E., Müller-Schlösser F., Kankofer M., and Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*, 66(5), 1115–1122.
81. Perdigón R., Cuesta E.O., Naranjo P. A., Arias T. (2002). Evaluación de la influencia del manejo reproductivo y el momento óptimo para realizar la cubrición en las cerdas. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* Vol: 9 No. 2. Gaveta Postal No.1, Punta Brava 19200, Ciudad de La Habana, Cuba. 43-47
82. Quiles A. y Hevia M. L. (2007). Infertilidad estacional en la cerda. Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria, universidad de Murcia. *Producción Animal*. 233

83. Quintero M. A., Mayorga-Torres J.M. y Cardona M. W. (2017). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of Veterinary Andrology* 2(1):30-37.
84. Quintero-Moreno A., González-Villalobos, D., López-Brea J. J., Estes C. M., Fernández-Santos Ma. R., Carvalho-Crociata J. L., Mejía-Silva W., y León-Atencio, G. (2009). Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. *Revista Científica*, 19(2), 153-158.
85. Quintero-Moreno, A., Calatayud D. y Mejía, W. (2016). Fertilidad y prolificidad en cerdas nulíparas inseminadas con semen criopreservado. nota técnica. *Revista Científica*, XXVI (4), 233-238.
86. Quirós-Rojas M., Madrigal-Valverde M., Camacho-Calvo M., Valverde A. (2018). Efecto del catéter de inseminación y el orden de parto sobre parámetros de producción en ganado porcino. *Tecnología en Marcha* 31(3), 86-97
87. Quispe H. A., Ciprián R., Ordoñez C., Ampuero E., Hernán C. (2015). Test hiposmótico en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados del conducto deferente. *SPERMOVA*. 5. 10-14.
88. Ramírez A., Aguilar S., Córdova A. y Méndez M. (2000). Evaluación y producción de semen de cerdo Pelón mexicano. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. <http://sian.info.vt/publicaciones/viencuent/ramirez.htm>
89. Restrepo B., G., Úsuga S. A. y Rojano B. A. (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Universidad CES Medellín, Colombia 8(1) pp. 69-81.
90. Ringwelski, J. M., Beever, J. E., & Knox, R. V. (2013). Effect of interval between inseminations when using frozen-thawed boar sperm on fertility and fetal paternity in mature gilts. *Animal Reproduction Science*, 137(3-4), 197–204.

91. Roa N., Tamasaukas R., Silva, A., Sánchez, J. (2005). Criopreservación de semen suino en Venezuela. Una revisión. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 6(5): 189-199.
92. Roca J., Carvajal G., Lucas X., María V. J. y Arsenio M.E. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 60, 77-87.
93. Roca, J., Parrilla, I., Bolarin, A., Martínez, E. A., & Rodríguez-Martínez, H. (2016). Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology*, 86(1), 187–193.
94. Rocha G., Castañeda J., y Valencia J. (2005). Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9 (3), 33-43.
95. Rodríguez P., Franco E., y Jiménez C. (2008). Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 55 (I): 22-28
96. Rogožarski D., Petrujkić B., Prokić N., Bojkovski J. y Mirilović M. (2013). Improving of pig production by intrauterine artificial insemination and other biotechnological solutions. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 70 (2), 310-316.
97. Rubio-Guillén J., Quintero-Moreno A. y González-Villalobos D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*, XIX (4), 382-389.
98. Rueda M., Arias T., Caballero N., Tosar M. y Acosta M. (2006). Análisis de la calidad espermática de sementales porcinos en dos tipos de porcicultura cubana. *Revista Computarizada de Producción Porcina*, 13(1) 48-53.

99. Sánchez R.A. y Zamora D.P. (2016). Efecto del medio hiposmótico sobre la vitalidad espermática en semen canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2), 288-293.
100. Sánchez-Sánchez R., Martín-Lluch M., P. de la Cruz S., Pérez-Garnelo C. Carrascosa A. González-Bulnes y Gómez-Fidalgo E. (2017). Biotecnología de la encapsulación del semen porcino. *SUIS* 136. 18-23.
101. Santos A. L. R., Bandeira B. T., Barboza G. D., Furtado C. L., Viana D. A. y Toniolli R. (2016). Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, 17(1) 26-35.
102. Saravia F., Hernández M., Wallgren M., Johannisson A., y Rodríguez-Martínez H. (2007). Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *International Journal of Andrology*, 30(6), 485–499.
103. Schäfer J., Waberski D., Jung M., and Schulze M. (2017). Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. *Animal Reproduction Science*, 187, 109–115.
104. Schulze M., Henning H., Rüdiger K., Wallner U., and Waberski D. (2013). Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology*, 80(9), 990–998.
105. Sellés S. E. (2008). Evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides porcinos refrigerados y congelados. Tesis Doctoral, *Departamento de Zoología y Antropología Física*. Universidad de Murcia
106. Smital J. (2009). Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*, 110 (3-4), 335–346.
107. Spinaci M., Bucci D., Chlapanidas T., Vallorani C., Perteghella S., Communod R., and Torre M. L. (2013). Boar sperm changes after sorting and encapsulation in barium alginate membranes. *Theriogenology*, 80(5), 526–532.

108. Stornelli M.A., Stornelli M.C., Arauz M.S. y De La Sota L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. aplicación y desarrollo en caninos. *Acta Veterinaria* 21(1), 58 -66.
109. Torretta M., Rabaglino M., Ferrero, S. (2010). Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11 (12), 1-20.
110. Tosar M., Digna Mendoza, E. León y F.J. Diéguez. (2002). Nota sobre la evaluación de verracos por su calidad espermática. Revista Computadorizada de Producción Porcina Vol: 9 No. 2 *Instituto de Investigaciones Porcinas* Gaveta Postal No.1, Punta Brava. La Habana, Cuba. (1) 24-27
111. Trujillo O. Ma. E., Contreras O.A. J., Espinosa H. S., Gutiérrez P. O., Hernández T. E., Nava N. J., Martínez G. R. G., Martínez R. R., Rojas C. J.C., Sánchez H. M., Viguera V. R. Ma. Y Castellanos S.G. Y. (2017). El verraco. Primera edición; Universidad Nacional Autónoma de México. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Ciudad de México.
112. Vadnais M.L., Kirkwood R.N., Tempelman R.J., Sprecher D.J., Chou, K. (2005). Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal of Reproduction Science*, 87(1): 121-32.
113. Velásquez V. C. (2013). Factores que influyen en la calidad y principales características seminales del verraco. *Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrion*.
114. Vigo D., Faustini M., Villani S., Orsini F., Bucco M., Chlapanidas T. and Torre M. L. (2009). Semen controlled-release capsules allow a single artificial insemination in sows. *Theriogenology*, 72(4), 439–444.
115. Wasilewska, K. and Fraser L. (2017). Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. *Animal Reproduction Science* 185,161–173.

116. Williams S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *Revista Brasileña Reproducción Animal.*, Belo Horizonte. 37 (2): 207-212.
117. Williams S., Fernández V., Gavazza M., Marmunti M., Zeinsteger P., Prena G. (2015). Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica. *Revista Analecta Veterinaria* 3 (1): 17-25.
118. Wolf J., and Smital J. (2009). Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *Journal of Animal Science*, 87 (5) 1620–1627.
119. Yáñez Q. F. W. (2015). Tesis de licenciatura: Estudio de la selección espermática en el tracto genital de la hembra basado en la morfometría del espermatozoide porcino. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, *Facultad de Ciencias Pecuarias*. Riobamba, Ecuador.
120. Yeste M. (2017). State of the art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*. 14 (1), 69-81.
121. Yeste, M., Castillo-Martín, M., Bonet, S., & Rodríguez-Gil, J. E. (2018). Impact of light irradiation on preservation and function of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 194, 19–32.

X. ANEXOS FOTOGRÁFICOS

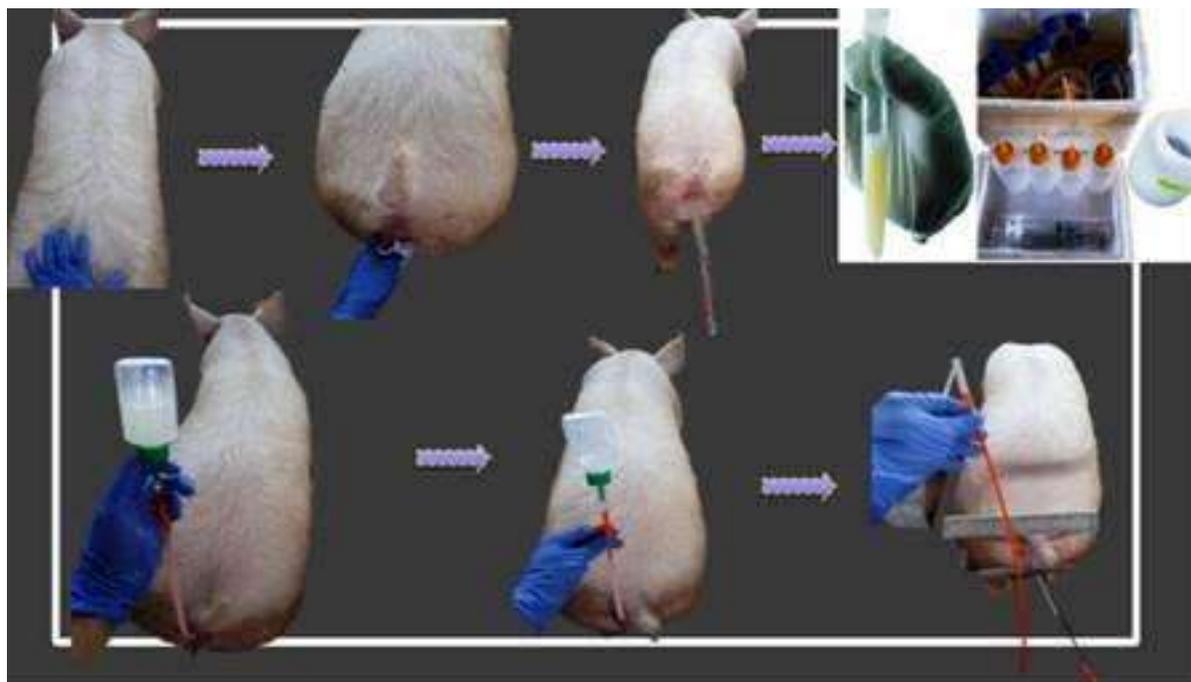




Figura 26. Viabilidad espermática del semen a 5 °C



Figura 27. Lechones nacidos, IAPC; semen a 5 °C



Figura 28. Lechones al día 15, IAPC; semen a 5 °C



Figura 29. Lechones destetados, IAPC; semen a 5 °C



Figura 30. Lote 1 de lechones destetados, IAPC; semen a 5 °C