

	<b>GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>	<b>Código</b>	FO-SB- 12/v0
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>	<b>Página</b>	1/1

### RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): EDWIN GERARDO APELLIDOS: RODRIGUEZ ROLON

NOMBRE(S): \_\_\_\_\_ APELLIDOS: \_\_\_\_\_

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA PECUARIA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): LEONARDO APELLIDOS: HERNÁNDEZ CORREDOR

CODIRECTOR:

NOMBRE(S): GIOVANNI MAURICIO APELLIDOS: BÁEZ SANDOVAL

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO REFRIGERADO EN EL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO

### RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo evaluar en semen refrigerado porcino la calidad y capacidad de conservación de dos diluyentes alternativos (A, B), comparados con cuatro controles (diluyentes comerciales). Se realizó un experimento factorial (factores: diluyentes, horas de evaluación) en la granja AnimalPro, ubicada en el área metropolitana de Cúcuta (Norte de Santander). Se colectaron 10 eyaculados de dos machos reproductores y cada eyaculado se dividió a su vez, en seis alícuotas conteniendo cada uno de los diluyentes. Utilizando Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA) y tinción eosina nigrosina, se evaluaron las variables respuesta: motilidad (M), vitalidad (V), y anormalidades morfológicas (AM) a las 0, 24, 48, y 72 horas (H). Los datos fueron procesados usando análisis de varianza luego de aplicar prueba de normalidad y las diferencias estadísticas fueron determinadas a través de prueba de Duncan. Los diluyentes alternativos presentaron similares valores de M a los diluyentes comerciales ( $P \leq 0.05$ ) a las 48 y 72H. Los valores de V fueron superiores en el diluyente B comparado con A, a las 24 y 48H ( $P \leq 0.05$ ), pero similares a las 72H, momento en el cual solo fueron inferiores a uno de los cuatro diluyentes comerciales. No se encontraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) para la variable AM. A pesar de haber encontrado algunas diferencias estadísticas con respecto a los diluyentes comerciales, los valores de calidad seminal utilizando los diluyentes alternativos no se ven comprometidos y ofrecen viabilidad para su uso y pueden ser considerados una alternativa para la refrigeración de semen porcino en la región.

PALABRAS CLAVE: Semen, porcino, diluyentes, CASA, refrigeración.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 77 PLANOS: \_\_\_\_\_ ILUSTRACIONES: \_\_\_\_\_ CD ROOM: 1

Elaboró		Revisó		Aprobó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
Fecha	24/10/2014	Fecha	05/12/2014	Fecha	05/12/2014

COPIA NO CONTROLADA

EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE  
SEMEN PORCINO REFRIGERADO EN EL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO.

EDWIN GERARDO RODRIGUEZ ROLON

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA PECUARIA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE  
SEMEN PORCINO REFRIGERADO EN EL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO.

EDWIN GERARDO RODRIGUEZ ROLON

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniero Pecuario

Director:

LEONARDO HERNÁNDEZ CORREDOR

PhD, Ingeniero de Producción Animal.

Codirector:

GIOVANNI MAURICIO BÁEZ SANDOVAL

Zootecnista, PhD.

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA PECUARIA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO  
MODALIDAD INVESTIGACIÓN**

**FECHA:** 20 de agosto de 2020

**HORA:** 15:00 p.m.

**LUGAR:** Sesión virtual (Videoconferencia por plataforma Google meet)

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA PECUARIA

**TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO:** "EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO COLOMBIANO"

**JURADOS:** DIANA SANDRA FARIDE VARGAS MUNAR  
OSCAR ANDRES RINCON BONILLA  
RUBÉN DARÍO CARREÑO CORREA

**DIRECTOR:** LEONARDO HERNÁNDEZ CORREDOR  
**CODIRECTOR:** GIOVANNI MAURICIO BAEZ SANDOVAL

<b>NOMBRE DEL ESTUDIANTE</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
EDWIN GERARDO RODRIGUEZ ROLON	1630448	4.3

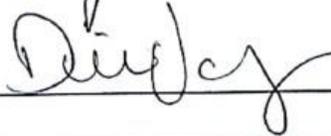
**OBSERVACIONES:**

APROBADO

**FIRMA DE LOS JURADOS:**



VoBo. Coordinador Comité Curricular





**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA  
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN  
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta,

Señores

BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS

Ciudad

Cordial saludo:

EDWIN GERARDO RODRIGUEZ ROLON, identificado con la C.C. N.º 1090438686, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado **EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO REFRIGERADO EN EL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO**, presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de INGENIERO PECUARIO; autorizo(amos) a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que, con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que **“los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores”**, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EDWIN GERARDO RODRIGUEZ ROLON, 1090438686 DE CUCUTA.

FIRMA Y CEDULA

## **Dedicatoria**

El presente trabajo de investigación es dedicado a Dios, por darnos la sabiduría y licencia de poder realizar cada paso de nuestra vida y la fortaleza de luchar por ese ideal, por darnos salud, para alcanzar nuestra meta trazada es la de ser buenos profesionales.

A mi Madre Alcira Rolón Jiménez, mis hermanos Diana Rodriguez Rolón, Juan Rodriguez Rolón y Daniel Rodriguez Rolón, que son cada día ese pilar de rectitud y constancia, de buenos modelos y enseñanzas sabias, mi padre Gerardo Rodriguez Palacios (Q.E.P.D) porque siempre fue su sueño tener unos hijos íntegros y buenos para la sociedad, gracias por los ejemplos, las críticas constructivas la confianza y sobre todo el sacrificio, para cumplir mis sueños.

A todos aquellos que directa o indirectamente estuvieron durante este proceso, dando su apoyo incondicional sin importar la dificultad y las estrategias replanteadas para lograrlo, mi respeto y admiración.

## **Agradecimientos**

Agradecerles de manera especial al Dr. Leonardo Hernández Corredor y Dr. Giovanni Mauricio Báez Sandoval, directores del trabajo de grado, por esa confianza puesta en mí desde ese primer día, de manera desinteresada fueron grandes guías en este proceso, aportando cada detalle de sus numerosos estudios y gran experiencia.

A la universidad Francisco de Paula Santander, su Facultad de Ciencias Agrarias y Programa de Ingeniería Pecuaria, por mostrar el camino a la superación profesional y facilitar cada estudio por medio de su infraestructura.

A los docentes, pieza clave en el aprendizaje, humanos con un espíritu grande de servir, que entregan sus conocimientos a las nuevas generaciones en busca del progreso social.

Al zootecnista Albeiro Silva Torres técnico de la empresa AnimalPro, su propietario German Alfonso Duarte Vargas y operarios (Héctor y Juan Carlos), que facilitaron el acceso y manejo de los reproductores para esta investigación.

Quiero agradecer a mi familia ejemplo a seguir en mi vida, mis padres que siempre han sido grandes consejeros, mis hermanos, compañeros incondicionales y profesionales talentosos, mi novia, por esa amistad tan grande y esa compañía constante para salir siempre adelante.

## Contenido

	<b>pág.</b>
Introducción	17
1. Problema	19
1.1 Título	19
1.2 Planteamiento del Problema	19
1.3 Formulación del Problema	20
1.4 Justificación	20
1.5 Objetivos	21
1.5.1 Objetivo general	21
1.5.2 Objetivos específicos	21
1.6 Delimitaciones	22
2. Marco Referencial	23
2.1 Antecedentes	23
2.1.1 Antecedentes bibliográficos	23
2.2 Marco Teórico	26
2.2.1 Contenido y funciones del diluyente	27
2.2.1.1 Energía	27
2.2.1.2 Solución tampón	27
2.2.1.3 Electrolitos y estabilizadores de membrana	28
2.2.2 Diluyentes disponibles	28
2.2.3 Costo del diluyente	28
2.2.4 Utilización de antibióticos en los diluyentes	29
2.2.5 Evaluación de la calidad seminal	29

2.2.5.1 Concentración espermática <b>Contenido</b>	30
2.2.5.2 Motilidad espermática	30
2.2.5.3 Valoración de la vitalidad espermática	30
2.2.5.4 Morfología espermática	31
2.3 Marco Contextual	31
2.4 Marco Legal	32
3. Diseño Metodológico	34
3.1 Tipo de Investigación	34
3.2 Población y Muestra	34
3.3 Hipótesis	34
3.4 Variables	35
3.5 Fases de la Investigación	35
3.6 Diseño del Experimento	36
3.6.1 Extracción, colección y procesamiento del semen.	37
3.6.2 Análisis de la concentración espermática	39
3.6.3 Dilución del semen	40
3.6.4 Evaluación del semen fresco y refrigerado	40
3.6.4.1 Análisis Computarizado de la Motilidad Espermática	40
3.6.4.2 Análisis de la Vitalidad	41
3.6.4.3 Análisis de la morfología	42
3.6.4.4 Análisis estadístico	43
4. Resultados	45
4.1 Evaluación Macroscópica General de cada Eyaculado Colectado	45
4.2 Motilidad Espermática	48

4.3 Progresividad y Linealidad Espermática	49
4.4 Vitalidad Espermática	51
4.5 Morfología Espermática	52
4.6 Análisis Económico de los Diluyentes	54
5. Discusiones	56
6. Conclusiones	60
7. Recomendaciones	62
Referencias Bibliográficas	63
Anexos	70

## Lista de Figuras

	<b>pág.</b>
Figura 1. Detalle de las instalaciones disponibles en la Finca Animal Pro, lugar del experimento. A. Entrada principal a la producción. B. Distribuciones internas	35
Figura 2. Infraestructura interna para el mantenimiento de los reproductores	37
Figura 3. Procedimiento de colecta del semen. A. Colecta del eyaculado en vaso plástico recolector. B. Evaluación macroscópica de la muestra seminal, nótese el color lechoso.	39
Figura 4. Medición de la concentración espermática del eyaculado por medio del espectrofotómetro de luz	39
Figura 5. Procesamiento del semen. A. Evaluación microscópica seminal. B. Dilución de la muestra con concentración de $4 \times 10^7$ /MI espermatozoides	40
Figura 6. Evaluación de los parámetros para la calidad seminal. A. Sistema CASA de análisis espermático ISAS. B. Evaluación de la capacidad de avance progresivo.	41
Figura 7. Evaluación de los parámetros para la calidad seminal. A. Tinción de eosina-nigrosina en espermatozoides de cerdo. B. Espermatozoide sin coloración (vivo); Espermatozoide con coloración (muerto)	42
Figura 8. Evaluación de los parámetros para la calidad seminal. A. Anormalidades morfológicas en espermatozoides (Cola flectada). B. Espermatozoide con doble cola	43
Figura 9. Distribución de los datos de motilidad espermática según el tiempo de conservación de semen	48
Figura 10. Interpretación de los datos de motilidad espermática según el diluyente de conservación de semen utilizado	49
Figura 11. Distribución de los datos de vitalidad espermática según el tiempo de conservación de semen.	51

Figura 12. Interpretación de los datos de vitalidad espermática según el diluyente de conservación de semen evaluado	52
Figura 13. Distribución de los datos de morfología espermática según el tiempo de conservación de semen.	53
Figura 14. Interpretación de los datos de morfología espermática según el diluyente de conservación de semen evaluado	53

## Lista de Tablas

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Relación de la composición de los diluyentes alternativos evaluados en el presente estudio (g/l)	36
Tabla 2. Parámetros obtenidos durante la primera evaluación al eyaculado del verraco recién colectado	45
Tabla 3. Efectos de los diluyentes sobre la motilidad espermática total, progresividad y linealidad, durante 72 horas a refrigeración	47
Tabla 4. Efectos de los diluyentes sobre la vitalidad y morfología espermática durante 72 horas en refrigeración	50
Tabla 5. Costos para la preparación de los diluyentes alternativos (A y B) en Cúcuta	54
Tabla 6. Comparación de medios alternativos y comerciales para la obtención de un 1 litro de diluyente	55

## Lista de Anexos

	<b>pág.</b>
Anexo 1. Registro fotográfico de la población de verracos estudiada	71
Anexo 2. Materiales y equipos utilizados	72
Anexo 3. Diluyentes utilizados durante la investigación	73
Anexo 4. Muestra colectada y evaluación de la concentración espermática	74
Anexo 5. Evaluación de la capacidad de avance progresivo por medio del ISAS	75
Anexo 6. Evaluación de la sobrevivencia espermática	76
Anexo 7. Evaluación de las estructuras morfológicas de las células, objeto de estudio	77

## Resumen

El estudio tuvo como objetivo evaluar en semen refrigerado porcino la calidad y capacidad de conservación de dos diluyentes alternativos (A, B), comparados con cuatro controles (diluyentes comerciales). Se realizó un experimento factorial (factores: diluyentes, horas de evaluación) en la granja AnimalPro, ubicada en el área metropolitana de Cúcuta (Norte de Santander). Se colectaron 10 eyaculados de dos machos reproductores y cada eyaculado se dividió a su vez, en seis alícuotas conteniendo cada uno de los diluyentes. Utilizando Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA) y tinción eosina nigrosina, se evaluaron las variables respuesta: motilidad (M), vitalidad (V), y anomalías morfológicas (AM) a las 0, 24, 48, y 72 horas (H). Los datos fueron procesados usando análisis de varianza luego de aplicar prueba de normalidad y las diferencias estadísticas fueron determinadas a través de prueba de Duncan. Los diluyentes alternativos presentaron similares valores de M a los diluyentes comerciales ( $P \leq 0.05$ ) a las 48 y 72H. Los valores de V fueron superiores en el diluyente B comparado con A, a las 24 y 48H ( $P \leq 0.05$ ), pero similares a las 72H, momento en el cual solo fueron inferiores a uno de los cuatro diluyentes comerciales. No se encontraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) para la variable AM. A pesar de haber encontrado algunas diferencias estadísticas con respecto a los diluyentes comerciales, los valores de calidad seminal utilizando los diluyentes alternativos no se ven comprometidos y ofrecen viabilidad para su uso y pueden ser considerados una alternativa para la refrigeración de semen porcino en la región.

## Abstract

The aim of the study was to evaluate the quality and preservation capacity of two alternative extenders (A, B) in cooled pig semen, compared to four controls (commercial extenders). A factorial experiment (factors: extender, evaluation hours) was carried out at the AnimalPro farm, located in the metropolitan area of Cúcuta (Norte of Santander). 10 ejaculates were collected from two boars and each ejaculate was split into six aliquots containing each of the extenders. Using Computer Assisted Semen Analysis (CASA) and eosin-nigrosin staining, the following response variables were evaluated: motility (M), vitality (V), and morphological abnormalities (AM) at 0, 24, 48, and 72 hours (H). Data were processed using analysis of variance after applying normality test and statistical differences were determined through Duncan's test. Both alternative extenders presented similar M values compared to commercial extender ( $P \leq 0.05$ ) at 48 and 72H. The V values were higher in extender B compared to A, at 24 and 48H ( $P \leq 0.05$ ), but similar at 72H, when they were lower than one out of four commercial extenders. No significant differences ( $P \geq 0.05$ ) were found for the AM variable. Despite having found some statistical differences against commercial extenders, the semen quality values using alternative extenders are not compromised and offer viability for their use and can be considered an alternative for the refrigeration of pig semen in the region.

## Introducción

La inseminación artificial porcina (IA), es una biotecnología reproductiva que está ligada a los medios diluyentes de conservación para el material genético, donde sus funciones han sido aumentar el volumen del eyaculado y preservar la viabilidad de los espermatozoides (Roca, Vazquez, Gil, Cuello, Parrilla & Martinez, 2009). A su vez, dentro de la industria la IA es utilizada en moderada o alta complejidad, de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen (fresco, refrigerado o congelado) utilizado, es por eso que alrededor del mundo se ha podido exponer la gran importancia que posee la IA, como una de las mejores biotecnologías adoptadas, que forjan grandes beneficios económicos (Riesenbeck, 2011).

Además, gracias a los trabajos realizados por Polge (1956), la técnica de IA fue reintroducida en el sector porcino, a su vez, se encuentra ampliamente difundida y se ha desarrollado mayormente en Europa (Gerrits, Lunney, Johnson, Pursel, Kraeling, Rohrer & Dobrinsky, 2005; Vyt, 2007; Riesenbeck, 2011), en Norte y Sur América. En la actualidad, la gran mayoría de las inseminaciones artificiales en las granjas de producción porcina provienen de semen refrigerado conservado a temperaturas que oscilan entre 15 y 18 °C, estas condiciones asociadas a un buen diluyente propician, que las dosis seminales puedan conservarse durante mas o menos 7 días, preservando los espermatozoides sus características fecundantes y garantizando la prolificidad en la camada (Torres, Fischman, Acerbo, García, Míguez & Domínguez, 2014).

Teniendo en cuenta que estos diluyentes comerciales de marcas europeas tienen un costo elevado y presenta una gran dificultad en el momento de la logística para la adquisición de ellos, se plantea una nueva estrategia con diluyentes alternativos para minimizar costos y a su vez, ser más asequible a los pequeños productores de la región, por tal motivo este trabajo de

investigación está enfocado en la evaluación de seis diluyentes (dos alternativos y cuatro comerciales), para la preservación de semen porcino bajo condiciones de refrigeración, como estrategia de conservación de material genético y a su vez mediar la viabilidad del medio alternativo con respecto al comercial para incentivar el mejoramiento de algunas prácticas de manejo reproductivo en busca de obtener siempre el mayor potencial a menores costos (Ochoa & Ortega, 2008).

## **1. Problema**

### **1.1 Título**

EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO REFRIGERADO EN EL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO.

### **1.2 Planteamiento del Problema**

Existen muchos trabajos ya publicados como el de Ochoa & Ortega (2008), que revisan los protocolos y reactivos que son necesarios para formular un diluyente alternativo, para una adecuada refrigeración de material genético y posterior IA en porcinos. Así mismo, para la elección del mejor diluyente a utilizar es esencial determinar el lapso de tiempo que transcurre entre la elaboración del diluyente y su utilización, además de aumentar en algunos casos, la concentración espermática de las dosis para compensar las pérdidas ocurridas por envejecimiento de los espermatozoides.

Sin embargo, acceder a los diluyentes comerciales utilizados para la IA porcina y principalmente en la región del Norte de Santander, es limitado y con precios elevados, además de una inadecuada logística de distribución que genera dificultades para la elección del diluyente idóneo de conservación y la recepción del producto en los tiempos requeridos, trayendo como resultado pérdidas no calculadas dentro de la producción (Lossada, 2013). De aquí deriva la motivación de evaluar la integridad funcional de espermatozoides de cerdos sometidos durante 72 horas a seis diluyentes de refrigeración, incluido dos diluyente de elaboración propia.

### 1.3 Formulación del Problema

¿Es posible mantener integridades espermáticas comparables a las obtenidas con diluyentes comerciales, utilizando dos diluyentes alternativos a 0, 24, 48 y 72 horas?

### 1.4 Justificación

La técnica reproductiva más utilizada en el mundo desde hace más de 90 años en los sistemas de explotación porcino ha sido la IA, desde principios del siglo XX esta técnica fue desarrollada en Rusia por Ivanov (Gadea, 2003). Además, la utilización de la IA se encuentra muy difundida, en países de la Unión Europea (Bélgica, Italia, Holanda y España) y algunos países americanos (México, EE.UU. y Canadá) superando los porcentajes de 75 y 80% de cerdas inseminadas con muestras refrigeradas respectivamente y diluidas en medios de conservación óptima (Roca *et al.*, 2006).

La valoración de la calidad de los diluyentes se considera de vital importancia Waberski, Petrunkina & Topfer (2008), ya que, permite comparar y decidir cuál es el diluyente más adecuado y que se adapte mejor a las condiciones de cada sistema de producción. Actualmente, las pruebas de mayor relevancia están basadas en valoraciones de la motilidad, vitalidad, morfología espermática que son observadas mediante el uso de un microscopio, y se deberían realizar en las explotaciones porcinas de la región con el objetivo de mejorar la calidad de su producción (Van Der Horst & Maree, 2009).

De hecho, en Colombia esta tecnología es estudiada y aplicada a un bajo porcentaje de las granjas porcinas, pero según el Fondo Nacional de la Porcicultura (2017), algunos departamentos le apuestan al incremento de dicho conocimiento como en el caso de Cundinamarca, Risaralda,

Antioquia y Sucre, demostrando un prometedor futuro económico para este rubro, lo cual incluye desde las capacitaciones, ventas de dosis seminales hasta la comercialización de los instrumentos necesarios para llevar a cabo dicho procedimiento.

Al mismo tiempo que crecen esas biotecnologías reproductivas en el país y principalmente en el departamento de Norte de Santander, se dificulta la obtención de estos medios de conservación, así que, cualquier logro en obtener un diluyente de fabricación propia (más económico) que conserve las características similares a los comerciales y asequible en tiempos, justifica esta investigación (Lossada, 2013).

## **1.5 Objetivos**

**1.5.1 Objetivo general.** Evaluar la integridad funcional de espermatozoides porcinos sometidos a refrigeración en dos diluyentes alternativos a base de glucosa.

**1.5.2 Objetivos específicos.** Como se muestra a continuación:

Establecer la capacidad de avance progresivo de los espermatozoides a través del tiempo de refrigeración (motilidad espermática) con el uso de diferentes diluyentes.

Determinar el porcentaje de sobrevivencia espermática a través del tiempo de evaluación (vitalidad espermática) con el uso de diferentes diluyentes.

Valorar la integridad estructural de los espermatozoides a través del tiempo de refrigeración (morfología espermática) con el uso de diferentes diluyentes.

## **1.6 Delimitaciones**

El presente trabajo, se realizó en la finca AnimalPro, municipio de Cúcuta, Norte de Santander, que cuenta con una producción de cerdos de raza Pietran, Pietran maximus, Duroc, distribuidos en salas individuales. La producción se encuentra ubicada a 243 msnm y una temperatura promedio de 32°C. Dicho estudio se realizó en un tiempo de 3 meses (12 semanas) donde se realizaron las colectas y evaluación para el análisis estadístico y la construcción del informe correspondiente al trabajo final de la investigación.

## 2. Marco Referencial

### 2.1 Antecedentes

En Norte de Santander, se encuentra poca información que evalúe la preservación de semen porcino bajo condiciones de refrigeración. Sin embargo, a nivel nacional e internacional, se encuentran fuentes de información científicas relacionadas con el tema.

**2.1.1 Antecedentes bibliográficos.** Cuenca & Avellaneda (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina - diluents used in swine artificial insemination. Los autores reportan trabajos realizados sobre inseminación artificial porcina, haciendo énfasis en la conservación del material seminal. Afirman, que se debe proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (albúmina de suero bovino [BSA]), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y los antibióticos para la inhibición del desarrollo microbiano (Rugeles, Caicedo, Almentero, Linares & Vergara, 2013; Alemán, Alfaro & Hurtado, 2006).

Actualmente la literatura reporta que un 99% de las inseminaciones realizadas en cerdas, utilizan semen conservado de forma ideal a temperatura de 15 a 20°C por uno a cinco días, ya que al estar por debajo de 14°C se presentan alteraciones de la membrana del espermatozoide repercutiendo en el poder fecundante del mismo. Por otra parte temperaturas por encima de los 20°C disminuyen enormemente la vida útil del semen. Por ese motivo, hoy en día los diluyentes comerciales utilizados en la industria porcina, se siguen modificando con el propósito de obtener semen con alta capacidad fecundante en procesos de IA (Rugeles *et al.*, 2013).

Además, características como volumen total, concentración y motilidad son indicadores utilizados para valorar la calidad del semen y su respuesta a la manipulación, particularmente la motilidad debido a su asociación con la selección correcta de diluyentes con excelente calidad que permiten utilizar dosis viables en la inseminación artificial llevadas a cabo en las diferentes granjas porcinas, y que se verán reflejadas en el número de lechones nacidos (Rugeles *et al.*, 2013).

Torres *et al.*, (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días. La utilización de semen enfriado en IA porcina sigue siendo una limitante, ya que la respuesta frente a temperaturas menores a 16 °C es aleatoria entre cerdos, y aún entre eyaculados del mismo cerdo. El objetivo del presente trabajo fue jerarquizar la capacidad para la conservación de dosis refrigeradas durante 4 días de tres diluyentes comerciales (Androstar Plus®, MRA® y MIII®), analizando: viabilidad, funcionalidad de membrana, integridad acrosomal y movilidad. No existieron diferencias ( $p>0,05$ ) entre diluyentes por lo que sería similar su capacidad de conservación durante un período de 4 días (Martin, Barón, Bragado, García, & Gil, 2013).

En general, la IA se realiza con semen fresco diluido o refrigerado a 16 - 18 °C, en el mismo día de extracción o almacenado por uno a cinco días (Gil, Garcia, Baron, Aparicio, Santos & Garcia , 009). Por otra parte, a partir de las primeras 2 horas, se produce una merma en los parámetros de calidad seminal. Sin embargo, se espera una tasa de parición del 80-85 % cuando el semen se usa dentro de las 48 horas después de la recolección, pero a la H72 disminuye la integridad del ADN desmejorando su eficacia y a su vez su tasa de fecundación (Roca, Vazquez, Gil, Cuello, Parrilla & Martinez, 2006; Karunakaran, Chakurkar, Ratnakaran, Naik, Mondal & Mondal, 2017).

Pinto, Caicedo, Almentero, Linares & Vergara (2013). Viabilidad de semen porcino refrigerado con Diluyente MRA®. - Viability Of Porcine Semen Preserved With Mra® diluent.

La dilución y conservación del semen es una alternativa que brinda la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco. De acuerdo con Ochoa & Ortega (2008), la motilidad de eyaculados porcinos diluidos con Androhep, MRA® y Reading (Modena®) fue significativamente superior para los eyaculados conservados en el diluyente Reading con respecto al tiempo de conservación, deteriorándose hacia las H120 en el periodo de conservación.

Así mismo, para la presente investigación se utilizaron eyaculados de verracos de razas mejoradas (Pietran y Duroc x Pietran) con edades entre dos a tres años, para la colección de semen se realizó dos veces a la semana, utilizando la técnica de manipulación manual, haciendo contracciones con la mano sobre el glande del pene. Además las características macroscópicas evaluadas fueron: color, olor, pH y volumen. Estas se valoraron en forma subjetiva, con excepción del pH y del volumen, utilizando los procedimientos de rutina establecidos por Córdova, Pérez, Méndez, Villa & Huerta (2005).

Con relación a la fracción del eyaculado diluida en Androhep se observó pérdida de la vitalidad espermática de 8,2% a la H24, similar a lo obtenido por Martínez *et al.* (1993), al conservar semen por un periodo de H24 a temperatura de 15°C. De la misma forma se presentó una pérdida de 6,55% de la vitalidad a las H48. Mientras que la vitalidad de la fracción del eyaculado diluido en proporción en MRA®, se afectó con pérdidas de 3,81 y 4,88% a la H24 y H48, respectivamente. Lo que indica, que la reducción de vitalidad espermática a la H48 es superior, en Androhep (14,55%), con respecto a la dilución en MRA® (8,69%).

## 2.2 Marco Teórico

Para obtener los resultados esperados después de la IA, es necesario contar con métodos que aseguren la dilución y conservación de las dosis seminales, para esto se necesita un medio diluyente, que debe garantizar la preservación de los espermatozoides, optimizando los resultados de fertilidad, prolificidad y calidad genética en la industria porcina (Cuenca & Avellaneda, 2017). Además, la composición debe conferir un buen poder amortiguador para mantener las condiciones de pH, igualmente brindar los azúcares necesarios para la supervivencia de las células, así como otros elementos más complejos que permitan asegurar una duración óptima (Ochoa & Ortega, 2008).

Si bien, lo más sustancial es partir de un semen de buena calidad, un buen diluyente de conservación de dicho material genético es fundamental (Vyt, 2007), sin llegar a causar daño en su estructura, disminuir su capacidad fecundante y aumentando el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides con un nivel de fertilidad adecuado (Ochoa & Ortega, 2008).

Así mismo, el semen del verraco puede ser preservado *in vitro* (Henning *et al.*, 2009), ya sea, en forma líquida o congelada. En cuanto al uso de semen congelado continúa siendo muy limitado con respecto al uso de semen fresco diluido, debido principalmente a su baja fertilidad, como consecuencia de su sensibilidad al shock térmico, que se traduce en alteraciones de la viabilidad del semen, lo cual se debe a la composición lipídica de sus membranas, esto parece ser el responsable del problema para aumentar la cantidad de días hábiles viable (Gadea, 2003).

Sin embargo, se reconoce que la fertilidad del semen refrigerado se pierde gradualmente durante largos períodos de almacenamiento, es por ese motivo que requiere de ciertos

componentes a base de glucosa, citrato, bicarbonato de sodio, EDTA, penicilina, que brinden integridad funcional a todas las células reproductivas, a nivel de progresividad, sobrevivencia y estructura morfológica (Waterhouse *et al.*, 2004).

**2.2.1 Contenido y funciones del diluyente.** Los diluyentes proporcionan una óptima conservación del eyaculado para la IA en las producciones porcinas, de igual manera aumentan el volumen de la colecta, garantizando una mayor cantidad de inseminaciones con el mismo material genético, por este motivo es importante que los medios de dilución garanticen todos los requerimientos nutricionales, energéticos, estabilizadores y de protección para los espermatozoides (Cuenca & Avellaneda, 2017). A continuación se describen los principales componentes para conservación de los espermatozoides en el medio diluyente.

**2.2.1.1 Energía.** Existen muchos estudios que demuestran que el espermatozoide del verraco es una célula con una alta eficiencia en la obtención de energía a partir de diversas fuentes, desde monosacáridos hasta lípidos, como el glicerol o sustratos como citrato y lactato (Medrano *et al.*, 2006), además, los azúcares más comunes que se agregan a los diluyentes, son la fructosa y la glucosa, siendo generalmente esta última la más utilizada (Ochoa & Ortega, 2008).

**2.2.1.2 Solución tampón.** El resultado del metabolismo aeróbico por parte del espermatozoide a partir de la glucosa, principalmente produce una disminución en el pH intracelular unido a una reducción del metabolismo, un pH cerca de  $7,4 \pm 0,2$ , que al disminuir también reduce la motilidad y el metabolismo energético, de allí la importancia de utilizar un grupo de agentes simples como el bicarbonato o el citrato de sodio y otros más complejos como son el (hidroximetil) Tris, Hepes, que pueden regular el pH en rangos más amplios desde 6,8 a 7,2 y no dependen de la temperatura (Gadea, 2003).

**2.2.1.3 Electrolitos y estabilizadores de membrana.** En la especie porcina el semen presenta una presión osmótica entre 290 – 300 mOsm, sin embargo son capaces de tolerar rangos bastante amplios (240 – 380 mOsm) (Fraser Gorszczaruk & Strzezek, 2001). Además, existen en el mercado algunos estabilizadores de membrana que se adicionan con el fin de prevenir alteraciones en la estructura y la función de las membranas de las células espermáticas. Las principales sustancias utilizadas son la albúmina sérica bovina (BSA), etiléndiamino tetraacético (EDTA), y alcohol polivinílico (Córdova, Muñoz, Córdova, Córdova & Pérez, 2015).

**2.2.2 Diluyentes disponibles.** Los diluyentes para IA (anexo 3) permiten que las células mantengan condiciones de inactividad metabólica y capacidad fecundante por un mayor tiempo, su clasificación varía de acuerdo a la duración como lo son, mediana de 4 a 5 días aproximadamente, recomendados en explotaciones que puedan realizar recolecciones diarias. Por otra parte, los de larga duración de 5-10 días, en la actualidad son utilizados por explotaciones donde realizan recolecciones 2 veces por semana o conservan las dosis por más de 5 días (Frydrychová, Čerovský, Lustyková & Rozkot, 2010).

En los años noventa se comercializó un nuevo diluyente caracterizado por compensar las proteínas perdidas del plasma seminal debido a la dilución; también presenta una presión osmótica ligeramente hipertónica (309 mOsm), este diluyente fue llamado Androhep® con una amplia aceptación en el sector como un diluyente de larga duración y en la actualidad semejantes a él se encuentran Acromax®, X-Cell®, Androstar® Plus, Vital®, SpermAid® y Mulberry® (Lossada, 2013).

**2.2.3 Costo del diluyente.** En países como Colombia, la adquisición de este tipo de medios diluyentes presenta gran dificultad, ya que dichos medios son importados de países como

España, Francia e Italia, y aunque existen muchas empresas colombianas que realizan la distribución nacional, los costos son elevados por que incluyen compras y procesos logísticos, sumado a ello se requiere mucho tiempo de espera para acceder al producto, además existen ciertas restricciones o medidas de importación necesarias para su compra en el exterior, lo cual crea la necesidad de diseñar diluyentes baratos de corta duración y económicos para cubrir la demanda nacional (Gadea, 2003).

**2.2.4 Utilización de antibióticos en los diluyentes.** Para impedir un crecimiento exacerbado de microorganismos en el semen refrigerado, el diluyente debe contener uno o varios antibióticos, ya que por mucho cuidado que se tenga, durante el proceso de recolección del semen siempre ocurre la contaminación de las dosis seminales con microorganismos de todo tipo, sumado a temperaturas de 16 a 17 °C crean un ambiente propicio para el crecimiento de los mismos, en su mayoría bacterias gram negativas (*E. coli*, *Salmonella sp.* y/o *Pseudomonas sp.*) (Althouse & Lu, 2005).

Además, estas son capaces de producir un serie de alteraciones entre las que se encuentran una reducción en la motilidad, aglutinaciones, aumento en el porcentaje de acrosomas anormales y una reducción del pH hasta niveles ácidos (5,7-6,4) (Althouse & Lu, 2005). Por lo anterior, se han aplicado penicilinas y otros, sin embargo, todavía no se han encontrado una combinación que funcione de manera óptima y se adapte a todas las condiciones imperantes en una granja porcina (Lossada, 2013).

**2.2.5 Evaluación de la calidad seminal.** Los análisis para evaluar la calidad seminal deben realizarse a todos los machos que se tengan como reproductores, ya que con este estudio se concluyen parámetros importantes sobre la integridad funcional de espermatozoides porcinos

(Lossada, 2013).

**2.2.5.1 Concentración espermática.** En todo estudio seminal se comienza con el recuento de espermatozoides (anexo 4), dicho proceso se conoce como la evaluación de concentración espermática, en ella se determina el número de células reproductivas masculinas por mililitro de eyaculado, puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen, entre estos métodos destaca la espectrofotometría, Así mismo, es un método indirecto, capaz de medir la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión, que este caso son los espermatozoides (Noakes *et al.*, 2001; Hafez, 2003).

**2.2.5.2 Motilidad espermática.** La motilidad espermática (anexo 5), es otro parámetro fundamental para valorar la calidad del eyaculado, consiste en evaluar el movimiento y avance que tienen los espermatozoides dentro de la muestra a analizar, además se clasifican según su progresividad en móviles progresivos, móviles no progresivos, y estáticos. A su vez, se valora la velocidad de movimiento entre rápidos, medios, lentos y estáticos, se concluye por el estudio porcentual que proyecta el sistema de análisis computarizado (Lossada, 2013).

Entre los principales factores que afectan el resultado final están la temperatura del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada, el tiempo que oscila entre la recogida y el análisis, la concentración espermática de la muestra, el diluyente utilizado, posibles patologías presentes, el tipo de objetivo utilizados y la iluminación del microscopio, los valores de configuración asociados al análisis computarizado CASA (anexo 2) y el área de las partículas analizadas (Vertegen *et al.*, 2002).

**2.2.5.3 Valoración de la vitalidad espermática.** El estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula y es uno de los parámetros más

investigados (anexo 6). Además, son numerosos los trabajos de investigación que determinan las diferencias entre los espermatozoides viables y no viables dentro de un eyaculado utilizando esta tinción (Eosina-Nigrosina), conjuntamente con otras técnicas donde los espermatozoides sin tinción están vivos y el espermatozoide con la integridad de la membrana dañada (muerto), se observa de color rosado oscuro (Zhu & Liu, 2000; Tsakmakidis *et al.*, 2010).

**2.2.5.4 Morfología espermática.** Es una herramienta potencialmente valorable para medir las variaciones celulares que influyen en el éxito del semen de verraco (Alm *et al.*, 2006; Tsakmakidis *et al.*, 2010). Ya que, pueden presentarse anomalías morfológicas; acrosoma hinchado, cabezas estrechas, microcefálicas y macrocefálicas, consideradas anomalías primarias (anexo 7). De igual manera, las anomalías secundarias; cabeza desprendida, cola doblada, gota citoplasmática distal, se encuentran, sobre todo, en los casos de perturbaciones bioquímicas del plasma seminal.

A su vez, la producción de espermatozoides anormales puede deberse a la edad, problemas nutricionales, enfermedades, factores ambientales (calor, heridas por traumatismos, sustancias tóxicas, cambio de ambiente), como por razones, hormonales o genéticas (Madrid, 2003). Por lo tanto, Para reducir la subjetividad de los análisis morfológicos, se implementa el análisis automatizado de la morfología espermática (ASMA), el cual se ha desarrollado y aplicado con éxito para el análisis espermático de semen de verraco (Boersma, Raûhofer & Stolla, 2001).

## **2.3 Marco Contextual**

La finca AnimalPro, lugar donde se realizó el trabajo de investigación se encuentra ubicada a 5 km de la cabecera municipal de la ciudad de Cúcuta Norte de Santander, en la vía principal hacia el municipio del Zulia, posee las siguientes condiciones ambientales: altura 243 msnm, con

una temperatura promedio de 32°C, además la explotación es enfocada en la producción de pie de cría y engorde de cerdos, comprende de un área de 18.000 m<sup>2</sup>, dentro de la granja se cuenta con una instalaciones de madera habitable por el administrador del lugar, una piara con 62 cubículos unitarios para madres en los que están incluidos 10 salas parideras, 4 cubículos de 9 m<sup>2</sup> receptores de lechones destetos, 2 cubículos de 5 m<sup>2</sup> para reproductores individuales.

Además, existe una población porcina de 86 animales de las razas Pietran, Pietran maximus, Landrace y cruces con Duroc, dos reproductores (Pietran maximus, Duroc) la reproducción es a través de IA, su alimentación y nutrición está basada en un mezclado con formulación propia de la granja, son alimentados 2 veces al día y suplementados con palmiste, el recurso hídrico llega a las instalaciones por bombeo mecánico desde una captación de agua subterránea que es llevada por una red de tuberías hasta los tanques de almacenamiento y distribución.

## **2.4 Marco Legal**

Constitución Política de Colombia de 1991. Artículo 65. La producción de alimentos gozará de la especial protección del Estado. Para tal efecto, se otorgará prioridad a las actividades agrícolas, pecuarias, pesqueras, forestales y agroindustriales.

Resolución 020033. Por medio de la cual se establecen los requisitos sanitarios y de bioseguridad para el registro de centrales de recolección e importadores de material genético.

Resolución 00 3650. Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro como productor de material genético.

Decreto 1648 del 2015. Por el cual se modifica el decreto único reglamentario del sector administrativo agropecuario pesquero y desarrollo rural en lo relacionado con el fondo nacional

de la porcicultura.

Conpes 3458 del 2007. Política nacional de sanidad e inocuidad para la cadena porcicola.

### **3. Diseño Metodológico**

#### **3.1 Tipo de Investigación**

El presente estudio es de tipo experimental cuantitativo, en el que se evaluó la motilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides porcinos sometidos durante diferentes horas (0, 24, 48 y 72) a refrigeración en cada uno de los diluyentes planteados.

#### **3.2 Población y Muestra**

La población (86 cerdos) en la que se realizó la investigación consta de dos verracos de las razas Pietran maximus y Duroc, como se logra ver en el anexo (1), establecidos en la granja porcicola AnimalPro en el área metropolitana del municipio de Cúcuta.

Como muestra, se evaluaron los eyaculados (10) colectados durante 3 semanas de los 2 machos bajo el mismo régimen de alimentación, infraestructura y manejo. Los animales permanecieron estabulados en cubículos individuales toda la investigación. Los animales no entraron en monta directa durante el periodo experimental puesto que son animales entrenados para monta en maniquí, A cada macho se le realizaron 2 colectas de semen por semana.

#### **3.3 Hipótesis**

De acuerdo a la evaluación de las variables experimentales, se plantean las siguientes hipótesis como posibles resultados al finalizar la investigación:

H0: El uso de los diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino refrigerado no incide en los parámetros de calidad seminal al ser comparados con diluyentes comerciales.

H1: El uso de los diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino refrigerado incide en los parámetros de calidad seminal al ser comparados con diluyentes comerciales.

### 3.4 Variables

Los diluyentes fueron evaluados como variables independientes.

Los parámetros de calidad seminal como variables dependientes (motilidad, vitalidad, morfología).

### 3.5 Fases de la Investigación

#### Ubicación del Ensayo

La recolección de las muestras se realizó en un sistema de producción de cerdos AnimalPro, ubicado en el municipio de San José de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia; coordenadas (Longitud:  $072^{\circ}58'97.51''$ , Latitud:  $N7^{\circ}89'83.29''$ ), en una zona caracterizada agro-ecológicamente como bosque seco tropical (Figura 1). Mientras que las evaluaciones del semen refrigerado se realizaron en un Laboratorio de Andrología de propiedad privada, dotado con la infraestructura necesaria para tal fin.



**Figura 1. Detalle de las instalaciones disponibles en la Finca Animal Pro, lugar del experimento. A. Entrada principal a la producción. B. Distribuciones internas**

### 3.6 Diseño del Experimento

Se evaluó como unidad experimental los eyaculados de dos verracos de raza Pietran maximus y Duroc, con edades comprendidas entre 10 y 12 meses y peso corporal entre los 140 y 180 Kg, con 5 repeticiones por macho, tomadas con un intervalo de 2 por semana (rutina del manejo previo de los verracos), luego cada eyaculado fue diluido en seis medios diferentes y refrigerado durante diferentes horas (0, 24, 48 y 72) a 16°C.

Como control se utilizaron 4 diluyentes comerciales (Androstar ® Plus, MR-A®, F8®, Vitasem®). La composición de los diluyentes alternativos A y B se detalla en la Tabla 1. Igualmente, a los diluyentes se les evaluó el pH, con cinta indicador, con el fin de garantizar valores cercanos al punto de neutralidad (pH=7). Por otra parte, es conocido por la literatura que los diluyentes comerciales poseen osmolaridad cercana a los 300 mOsm (280 – 320) (Gadea, 2003; Minitube ®) (Tabla 1).

**Tabla 1. Relación de la composición de los diluyentes alternativos evaluados en el presente estudio (g/l)**

Componentes	Diluyentes	
	(A)	(B)
Glucosa anhidra	50	40
Citrato sódico	3,5	3,5
Bicarbonato sódico	1,25	1,25
EDTA	3,5	3,5
<b>Antibióticos</b>		
Penicilina G Benzatinica	+	+
Penicilina G Procaínica	+	+
Penicilina G Potásica	+	+
pH	6,62±0,05	6,32±0,06
<b>Osmolaridad (teórica)</b>	<b>308±4,26</b>	<b>291±4,26</b>

no posee el ingrediente, +: posee el ingrediente.

Los dos verracos fueron tenidos bajo las mismas condiciones ambientales, controlando el confort higrotérmico (Figura 2) y con una dieta basada en alimento mezclado con formulación propia de la granja, disponibilidad de agua y un programa sanitario, todo esto bajo las recomendaciones del profesional encargado.



**Figura 2. Infraestructura interna para el mantenimiento de los reproductores**

**3.6.1 Extracción, colección y procesamiento del semen.** Los eyaculados fueron colectados los días martes y viernes entre las 7:00 am a 10:00 am, la técnica que se utilizó en este estudio fue la extracción con mano enguantada o doble guante, donde el primer guante se encargó de la limpieza y el mantenimiento antes de la recogida del semen, esto sucedía cuando el animal se sube al potro y se realizaba el vaciado de la bolsa prepucial para eliminar los restos de orina, se debe liberar todas esas impurezas y limpiar con una servilleta o toalla desechable desinfectando el área del prepucio, se procede a retirar el primer guante e iniciar la sujeción del glande del pene del verraco para su posterior eyaculado con el segundo guante puesto (Vyt, 2007; Knox *et al.*, 2008), este proceso se realizó durante 3 semanas consecutivas. Además, el eyaculado se extraía en un vaso plástico recolector de 7 onzas o 210 cc situado dentro de termo temperado a 37 °C y debidamente protegido.

La colecta se constituyó por varios pasos:

Eliminar restos de orina y fluidos del verraco para no contaminar la muestra de semen, se realizó estimulando la bolsa prepuccial.

Extracción de la fracción rica en espermatozoides para garantizar una muestra de calidad seminal, donde se colectó solo la fracción media del total eyaculado, ya que este es dividido en fracción pre espermática (color transparente), fracción espermática o rica (color lechoso, Figura 3), fracción post espermática y tapioca (grumos gelatinosos).

Colocar el vaso con el eyaculado dentro del baño María a 37°C.

Solo se procesaron las muestras seminales con volumen, color, olor y aspecto de acuerdo a los patrones pre establecidos (Figura 3). Además, con evaluaciones microscópicas para observar los parámetros de estudio (motilidad  $\geq 3$ , número total de espermios por eyaculado superior a  $24 \times 10^9$  y anormalidades espermáticas  $\leq 20\%$ ) similares a las exigencias internacionales (Kondracki, 2003). Del mismo modo, se descartaron aquellas muestras con colores y/o apariencias anormales (rojizos, pardos, grises, amarillentos o con presencia de flóculos de pus), que muestren contaminación de la muestra seminal.



**Figura 3. Procedimiento de colecta del semen. A. Colecta del eyaculado en vaso plástico recolector. B. Evaluación macroscópica de la muestra seminal, nótese el color lechoso.**

**3.6.2 Análisis de la concentración espermática.** La concentración de espermatozoides se evaluó con el método de la espectrofotometría (anexo 4), capaz de medir las partículas, que en este caso fueron los espermatozoides (Noakes et al., 2001; Hafez, 2003). Dicho método se desarrolló en un tubo de ensayo con una solución estándar de 1 ml, aplicando 25  $\mu$ L de semen fresco recién colectado, se introdujo dentro de equipo (espectrofotómetro), y por medio de un análisis, identifica en un conteo instantáneo la concentración total de espermatozoides por ml (Figura 4).



**Figura 4. Medición de la concentración espermática del eyaculado por medio del espectrofotómetro de luz**

**3.6.3 Dilución del semen.** Los eyaculados aptos para el estudio fueron diluidos en los seis medios propuestos y se envasaron en viales de 2 ml. Con una concentración espermática  $4 \times 10^7$  ml espermatozoides por dosis (Figura 5). Los viales se dejaron a temperatura ambiente y cubiertos para evitar el exceso de luz durante 2 horas, al término del tiempo se introdujeron en una nevera adaptada a un rango de temperatura que oscila entre 15 a 18 °C hasta su próxima evaluación a las 24 horas (Lossada, 2013).



**Figura 5. Procesamiento del semen. A. Evaluación microscópica seminal. B. Dilución de la muestra con concentración de  $4 \times 10^7$ /ml espermatozoides**

**3.6.4 Evaluación del semen fresco y refrigerado.** A partir del momento en que se realizó la colecta y cuando el periodo de tiempo empezó a aumentar, se fueron reduciendo los parámetros de calidad seminal, es por ese motivo que se hizo necesario llevar un seguimiento de evaluación y análisis para ese material genético proveniente del eyaculado de los dos cerdos, dichos estudios se realizaron bajo los sistemas de análisis computarizado y otros a nivel micro y macroscópicos (Lossada, 2013).

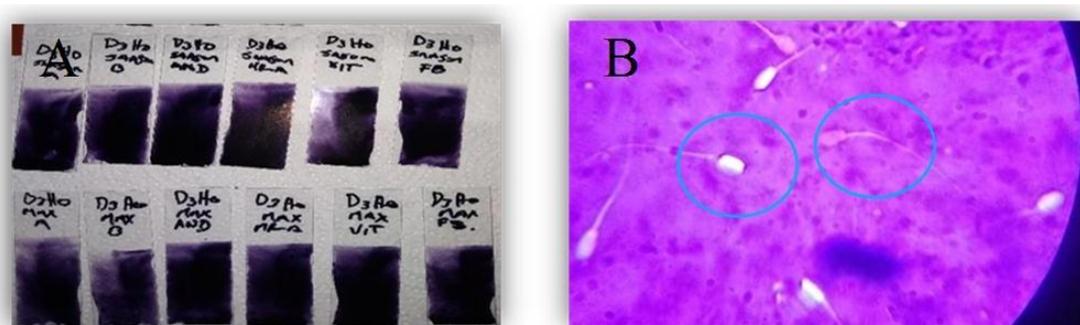
**3.6.4.1 Análisis Computarizado de la Motilidad Espermática.** Este análisis computarizado se le realizó a todas las muestras de semen (fresco y refrigerado). Para evaluar las muestras se utilizó el Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA) a través del (Sistema Integral de Análisis de Semen) ISAS® (Broekhuijse *et al.*, 2011). Para tal fin, se aplicó una gota de semen,

en la spermtrack, para luego ser llevada al microscopio y analizada utilizando el software en el módulo de motilidad mencionado, conectado a un procesador Intel Core I5 (Figura 6), la intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara fue igual para todas las muestras (Quintero *et al.*, 2009).



**Figura 6. Evaluación de los parámetros para la calidad seminal. A. Sistema CASA de análisis espermático ISAS. B. Evaluación de la capacidad de avance progresivo.**

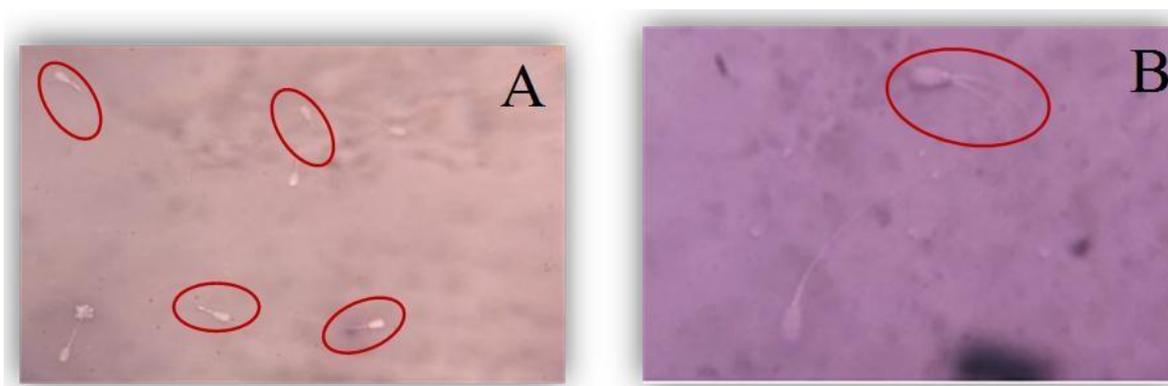
**3.6.4.2 Análisis de la Vitalidad.** Esta prueba se le realizó al semen fresco (H0) y refrigeradas (H24, 48 y 72) (anexo 6). Se aplicó 10  $\mu$ L de semen en un portaobjeto, se mezcló con 10  $\mu$ L del colorante eosina-nigrosina homogenizando y dejando secar (Figura 7), fueron observados en el microscopio con el objetivo de inmersión de 100X. Además, los espermatozoides muertos (teñidos), fueron los que presentaron membranas plasmáticas dañadas, y las cabezas se observaron de color rosado, por el contrario en los espermatozoides vivos, las cabezas se observaron de color blanco (no teñidos, Figura 7). El resultado final se expresó en porcentaje (Bamba, 1988).



**Figura 7. Evaluación de los parámetros para la calidad seminal. A. Tinción de eosina-nigrosina en espermatozoides de cerdo. B. Espermatozoide sin coloración (vivo); Espermatozoide con coloración (muerto)**

**3.6.4.3 Análisis de la morfología.** La morfología se examinó en el semen fresco y refrigerado en frotis teñidos con eosina-nigrosina (Bamba, 1988; Quintero *et al.*, 2009). En una lámina, se mezcló suavemente una alícuota de semen de 10  $\mu$ L con colorante, luego se secaron los frotis por 30 minutos. Posteriormente, fueron observados en un microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X), se contaron un total de 100 espermatozoides por frotis, los cuales fueron clasificados según su apariencia en: normales y los que presentaron morfoanomalías (Figura 8).

Las morfoanomalías incluyeron defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anomalías en el flagelo (número, forma y tamaño), signos de inmadurez, (presencia de gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD)).



**Figura 8. Evaluación de los parámetros para la calidad seminal. A. Anormalidades morfológicas en espermatozoides (Cola flectada). B. Espermatozoide con doble cola**

**3.6.4.4 Análisis estadístico.** Los datos obtenidos de las evaluaciones anteriormente descritas fueron introducidos en sistema de análisis Microsoft Excel para Windows 10, para luego ser exportados al sistema estadístico R (GPL, versión 3.6.1. Nueva Zelanda, 2019) y se analizaron mediante pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene), se usó el Modelo Lineal General. Los diluyentes fueron evaluados como variables discretas independientes y los parámetros de calidad seminal como variables cuantitativas (motilidad, vitalidad, morfología), los resultados se expresan en la media de los valores  $\pm$  Error estándar (Lossada, 2013). Se utilizó el modelo estadístico factorial y no existieron interacciones entre tratamientos.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$ : Variable respuesta (vitalidad, motilidad, morfología)

$\mu$  = media general de las observaciones

$T_i$  = efecto de  $i$ -ésimo tratamiento (6 diluyentes)

$H_{ij}$  = efecto de j-ésimo tiempo de almacenamiento de los diluyentes (0, 24, 48, 72) horas

$\epsilon_{ijk}$  = error experimental asociado a las observaciones.

## 4. Resultados

Se presentan los resultados del análisis de un total de 10 eyaculados para los parámetros de motilidad, progresividad y linealidad, los cuales cumplieron con los parámetros establecidos al momento de valorar la calidad seminal para esta especie iniciando con la evaluación macroscópica general.

### 4.1 Evaluación Macroscópica General de cada Eyaculado Colectado

En la tabla 2, se muestran los datos obtenidos de las evaluaciones macroscópicas que se realizaron en campo a cada uno de los eyaculados recién colectados, estos datos son importantes porque es la primera evaluación que se le realiza al semen, en este chequeo se identifican parámetros relevantes para garantizar la calidad de dicho material genético que va a ser sometido a dilución, en los 6 medios de conservación, y refrigerados a 16°C, por 72 horas, donde se evaluaron cada H0, H24, H48, H72, por ser tan riguroso este proceso es importante seleccionar muy bien las muestras a conservar, que tengan una concentración óptima, volumen adecuado, que los cerdos se encuentre en la edad para ser reproductores, y que su apariencia del eyaculado sea la mejor.

**Tabla 2. Parámetros obtenidos durante la primera evaluación al eyaculado del verraco recién colectado**

	<b>Parámetros</b>	<b>Colecta 1</b>	<b>Colecta 2</b>	<b>Colecta 3</b>	<b>Colecta 4</b>	<b>Colecta 5</b>
Verraco (1)	Edad	10 meses				
	Volumen	180 MI	175 MI	182 MI	196 MI	189 MI
	Concentración	398x 10 <sup>6</sup>	385x 10 <sup>6</sup>	329x 10 <sup>6</sup>	430x 10 <sup>6</sup>	391x 10 <sup>6</sup>
	PH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
	Color	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Verraco (2)	Edad	12 meses				
	Volumen	181 MI	189 MI	196 MI	202 MI	179 MI
	Concentración	397x 10 <sup>6</sup>	379x 10 <sup>6</sup>	392x 10 <sup>6</sup>	416x 10 <sup>6</sup>	368x 10 <sup>6</sup>
	PH	7	7	7	7	7
	Color	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Parámetros obtenidos en los eyaculados recién colectados de los dos cerdos reproductores evaluados, donde sus resultados fueron normales.

En la siguiente tabla 3, se puede observar el efecto de los diluyentes sobre la motilidad espermática, la progresividad y linealidad, durante el transcurso de tiempo evaluado y que a su vez, se mantuvo en refrigeración. Estos datos expresan los valores obtenidos por cada uno de los medios diluyentes y hacen referencia a la media aritmética y el error estándar.

**Tabla 3. Efectos de los diluyentes sobre la motilidad espermática total, progresividad y linealidad, durante 72 horas a refrigeración**

	A	Androstar®	B	F8®	MRA®	Vitasem®	
Motilidad total							
H0	74.37 ± 2.51 <sup>b</sup>	75.96 ± 1.9 <sup>ab</sup>	75.27 ± 1.79 <sup>ab</sup>	88.37 ± 0.98 <sup>a</sup>	84.9 ± 1.64 <sup>a</sup>	76.03 ± 1.68 <sup>ab</sup>	P≤0.05
H24	51.03 ± 4.09 <sup>c</sup>	61.7 ± 5.66 <sup>b</sup>	50.86 ± 6.09 <sup>c</sup>	57.96 ± 5.86 <sup>bc</sup>	49.15 ± 2.65 <sup>c</sup>	72.3 ± 5.7 <sup>a</sup>	
H48	46.36 ± 7.32 <sup>b</sup>	58.9 ± 5.61 <sup>a</sup>	50.6 ± 7.05 <sup>b</sup>	56.7 ± 5.91 <sup>a</sup>	42.625 ± 6.99 <sup>b</sup>	61.2 ± 1.05 <sup>a</sup>	
H72	44.35 ± 1.4 <sup>b</sup>	49.82 ± 2.42 <sup>a</sup>	41.9 ± 3.36 <sup>b</sup>	50.8 ± 4.65 <sup>a</sup>	39.7 ± 1.46 <sup>b</sup>	46.65 ± 4.62 <sup>a</sup>	
Progresividad							
H0	34.55 ± 1.99 <sup>c</sup>	37.32 ± 1.71 <sup>c</sup>	36.36 ± 1.75 <sup>c</sup>	51.34 ± 1.68 <sup>a</sup>	46.97 ± 1.57 <sup>b</sup>	38.0 ± 1.59 <sup>c</sup>	P≤0.05
H24	16.76 ± 2.37 <sup>b</sup>	22.63 ± 2.68 <sup>ab</sup>	20.1 ± 3.71 <sup>ab</sup>	22.35 ± 2.64 <sup>ab</sup>	13.3 ± 0.24 <sup>c</sup>	29.56 ± 1.41 <sup>a</sup>	
H48	16.18 ± 1.37 <sup>ab</sup>	19.38 ± 3.13 <sup>a</sup>	16.76 ± 1.96 <sup>ab</sup>	22.24 ± 4.54 <sup>a</sup>	12.98 ± 0.64 <sup>b</sup>	17.75 ± 1.4 <sup>ab</sup>	
H72	13.25 ± 0.25 <sup>b</sup>	19.05 ± 1.27 <sup>a</sup>	10.85 ± 0.88 <sup>b</sup>	20.43 ± 1.2 <sup>a</sup>	11.92 ± 2.17 <sup>b</sup>	17.275 ± 2.89 <sup>a</sup>	
Linealidad							
H0	64.88 ± 0.95 <sup>a</sup>	65.02 ± 0.88 <sup>a</sup>	64.94 ± 0.78 <sup>a</sup>	70.66 ± 0.8 <sup>a</sup>	66.1 ± 0.87 <sup>a</sup>	69.9 ± 0.94 <sup>a</sup>	P≥0.05
H24	57.25 ± 0.54 <sup>a</sup>	59.65 ± 1.17 <sup>a</sup>	55.58 ± 0.73 <sup>a</sup>	59.35 ± 0.01 <sup>a</sup>	57.44 ± 0.4 <sup>a</sup>	60.96 ± 0.78 <sup>a</sup>	
H48	56.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	59.02 ± 0.77 <sup>a</sup>	55.25 ± 0.48 <sup>a</sup>	58.43 ± 1.43 <sup>a</sup>	55.8 ± 0.63 <sup>a</sup>	57.3 ± 0.82 <sup>a</sup>	
H72	54.96 ± 0.99 <sup>a</sup>	56.56 ± 0.77 <sup>a</sup>	54.76 ± 1.1 <sup>a</sup>	57.22 ± 0.96 <sup>a</sup>	54.975 ± 0.83 <sup>a</sup>	54.6 ± 0.95 <sup>a</sup>	

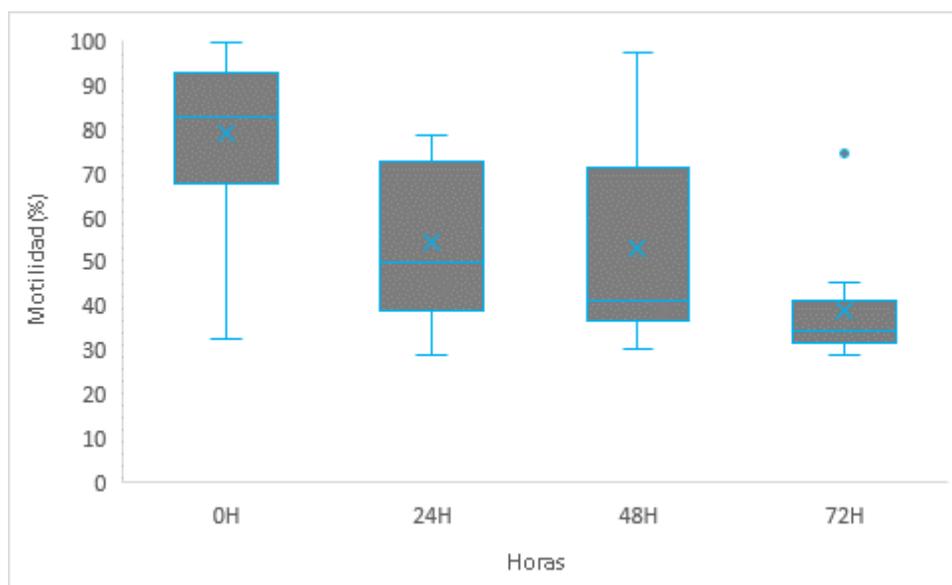
Los resultados se expresan en valores de media aritmética ± Error estándar.

H0: Hora cero (fresco recién diluido); H24: Hora veinticuatro; H48: Hora cuarenta y ocho; H72: Hora setenta y dos de la investigación.; Diluyentes: A: Alternativo 1; B. Alternativo 2; Androstar®: Comercial 1; F8®: Comercial 2; MRA®: Comercial 3; Vitasem®: Comercial 4. Letras diferentes en minúscula (a,b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas (P≤0,05) entre los diluyentes evaluados en la investigación; en este caso no se aplicara para letras diferentes en mayúscula (A,B) factor tiempo.

## 4.2 Motilidad Espermática

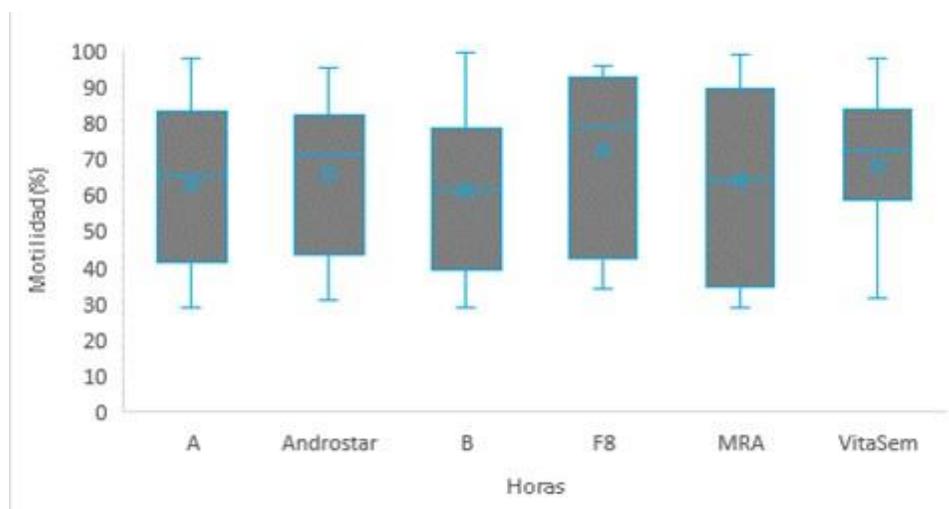
Como se muestra en la tabla 3, se encontraron diferencias significativas sólo en algunos descriptores de motilidad ( $P \leq 0,05$ ), obteniendo el mejor resultado a la hora cero (H0) de las muestras diluidas en el medio comercial F8® con un 88.37%, seguido del también comercial MR-A® con un 84.9%, siendo para esta función el dato menor correspondiente al diluyente alternativo A con un 74.37% de motilidad; para la evaluación en la H24 y H48, el resultado superior lo obtuvo el medio comercial Vitasem®, con el 72.3% y 61.2% respectivamente; el resultado obtenido en la última evaluación H72, como dato inferior lo muestra el medio MR-A® con un mínimo de 39.7%; los diluyentes A y B se mantienen en un resultado promedio.

Durante la H0, la motilidad muestra unos resultados de mayor amplitud frente a los obtenidos en las horas siguientes de evaluación, con una media superiores al 74%. (Ver figura 9).



**Figura 9. Distribución de los datos de motilidad espermática según el tiempo de conservación de semen**

Las muestras del diluyente F8® fueron las que obtuvieron los mejores resultados de motilidad durante las 72H y entre los medios alternativos son minúsculas las diferencias (Ver figura 10).



**Figura 10. Interpretación de los datos de motilidad espermática según el diluyente de conservación de semen utilizado**

### 4.3 Progresividad y Linealidad Espermática

El resultado más alto a la H0 se logró del diluyente comercial F8®, con datos superiores al 50 y 70%, y como resultados más bajo se obtuvo 34.55% y 64.88% correspondientes a las muestras del diluyente A, con el paso de la 72 H se observó que para la progresividad, el resultado más alto es 20.43%, y el de linealidad es 57.22% correspondientes al diluyente comercial F8®, los parámetros evaluados con valores significativos más altos son obtenidos del diluyente comercial F8®. El diluyente alternativo A y B, obtuvo datos inferiores para progresividad a la H0 y H72; y en linealidad para el B a las H24 y H48.

En la tabla 4, se presentan los resultados de los parámetros de vitalidad y morfología de los espermatozoides en las diferentes horas evaluadas.

**Tabla 4. Efectos de los diluyentes sobre la vitalidad y morfología espermática durante 72 horas en refrigeración.**

	A	Androstar®	B	F8®	MRA®	Vitasem®	
Vitalidad							
H0	71.92 ± 1.11 <sup>b</sup>	67.27 ± 1.66 <sup>b</sup>	69.88 ± 1.32 <sup>b</sup>	83.45 ± 1.32 <sup>a</sup>	72.18 ± 1.95 <sup>b</sup>	65.63 ± 2.06 <sup>b</sup>	P ≤ 0.05
H24	60.2 ± 1.11 <sup>b</sup>	62 ± 2.47 <sup>a</sup>	67 ± 0.58 <sup>a</sup>	69 ± 0.58 <sup>a</sup>	52 ± 1.92 <sup>b</sup>	65 ± 0.84 <sup>a</sup>	
H48	39.5 ± 3.54 <sup>c</sup>	58 ± 0.58 <sup>b</sup>	66.8 ± 1.76 <sup>a</sup>	67.2 ± 1.76 <sup>a</sup>	38.5 ± 0.66 <sup>c</sup>	53 ± 0.58 <sup>b</sup>	
H72	38 ± 0.58 <sup>b</sup>	50 ± 0.26 <sup>a</sup>	38 ± 0.26 <sup>b</sup>	23 ± 0.26 <sup>c</sup>	25.25 ± 2.5 <sup>c</sup>	33 ± 0.26 <sup>b</sup>	
Morfología							
H0	96.84 ± 0.52 <sup>a</sup>	96.72 ± 0.38 <sup>a</sup>	94.22 ± 0.54 <sup>a</sup>	96 ± 0.26 <sup>a</sup>	94.5 ± 0.66 <sup>a</sup>	94.54 ± 0.45 <sup>a</sup>	P ≥ 0.05
H24	94.2 ± 0.38 <sup>a</sup>	95.5 ± 0.13 <sup>a</sup>	92.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	95.66 ± 0.83 <sup>a</sup>	94.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	92.66 ± 0.33 <sup>a</sup>	
H48	94.0 ± 0.26 <sup>a</sup>	94.8 ± 0.57 <sup>a</sup>	91.5 ± 0.13 <sup>a</sup>	93.81 ± 0.47 <sup>a</sup>	93.9 ± 0.34 <sup>a</sup>	92.25 ± 0.29 <sup>a</sup>	
H72	90.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	92.66 ± 1.74 <sup>a</sup>	90.33 ± 0.66 <sup>a</sup>	93.6 ± 0.82 <sup>a</sup>	91 ± 0.47 <sup>a</sup>	86.5 ± 0.39 <sup>a</sup>	

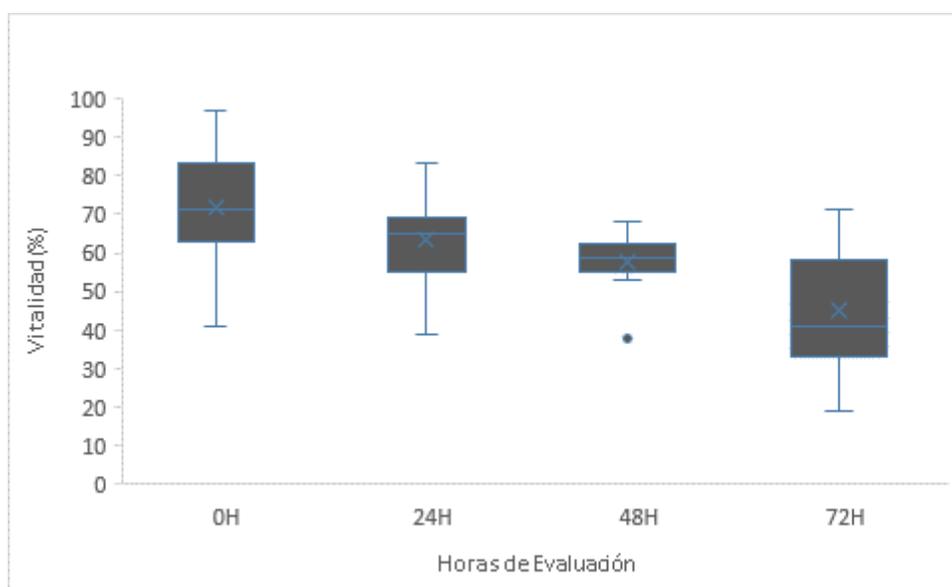
Los resultados se expresan en valores de media aritmética ± Error estándar.

H0: Hora cero (fresco recién diluido); H24: Hora veinticuatro; H48: Hora cuarenta y ocho; H72: Hora setenta y dos de la investigación.; Diluyentes: A: Alternativo 1; B. Alternativo 2; Androstar®: Comercial 1; F8®: Comercial 2; MRA®: Comercial 3; Vitasem®: Comercial 4. Letras diferentes en minúscula (a.b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05) entre los diluyentes evaluados en la investigación; en este caso no se aplicara para letras diferentes en mayúscula (A.B) factor tiempo.

#### 4.4 Vitalidad Espermática

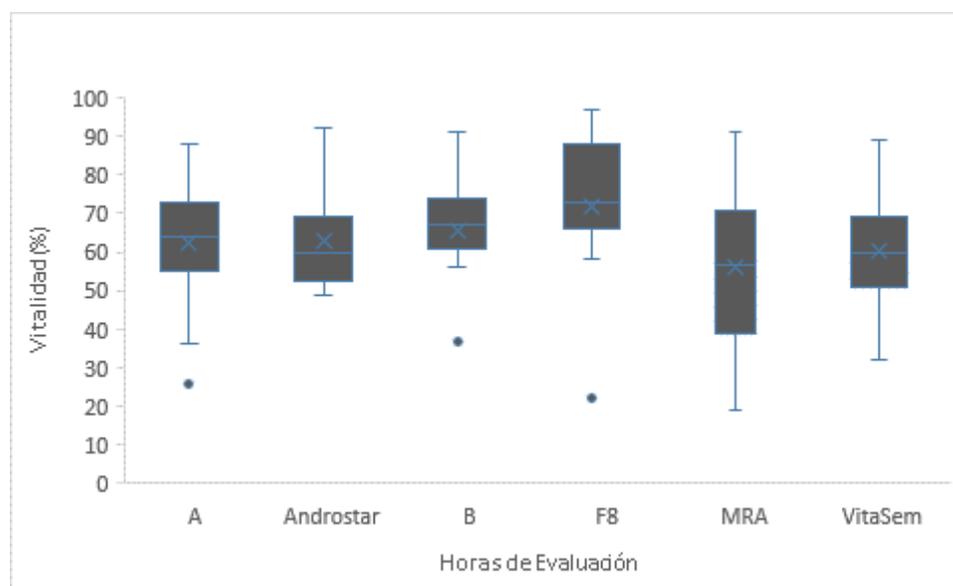
Como puede observarse en la tabla 4, el diluyente A presentó un 71.92% de vitalidad a la H0, siendo el tercer dato más alto después del F8® y MRA®, en la H24 y H48 el segundo mejor resultado lo obtuvo el diluyente alternativo B, después del diluyente comercial F8®, con un 67% y 66.8% la H72 quién presenta una vitalidad del 50% es el diluyente comercial Androstar®, seguido de los diluyentes A y B con un 38%.

Fisiológicamente la vitalidad de las células va disminuyendo con respecto al pasar de las horas, pero se mantiene un rango amplio de datos como se evidencia en la siguiente figura, donde la línea horizontal identifica la mediana de los datos y cada muestreo va en detrimento. (Ver figura 11).



**Figura 11. Distribución de los datos de vitalidad espermática según el tiempo de conservación de semen.**

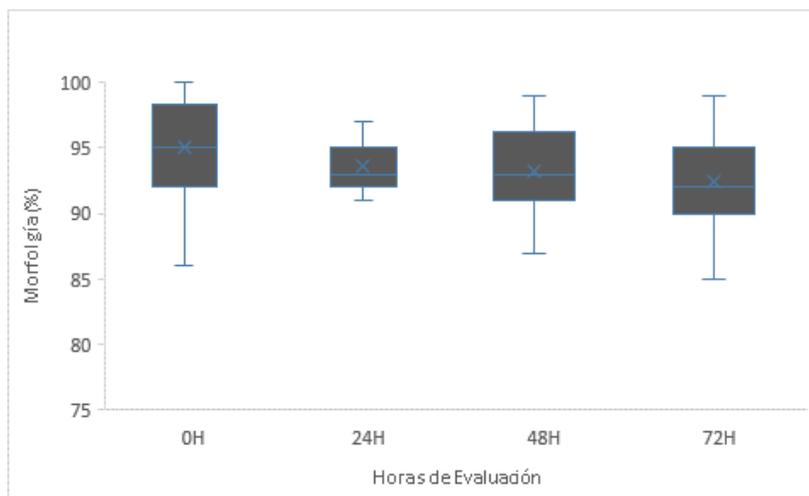
El porcentaje más alto al evaluar la vitalidad en cada uno de los medios durante las 72H, lo obtiene el diluyente F8®, con una mediana superior al 70%, mientras los demás están entre 55 - 65% (ver Figura 12).



**Figura 12. Interpretación de los datos de vitalidad espermática según el diluyente de conservación de semen evaluado**

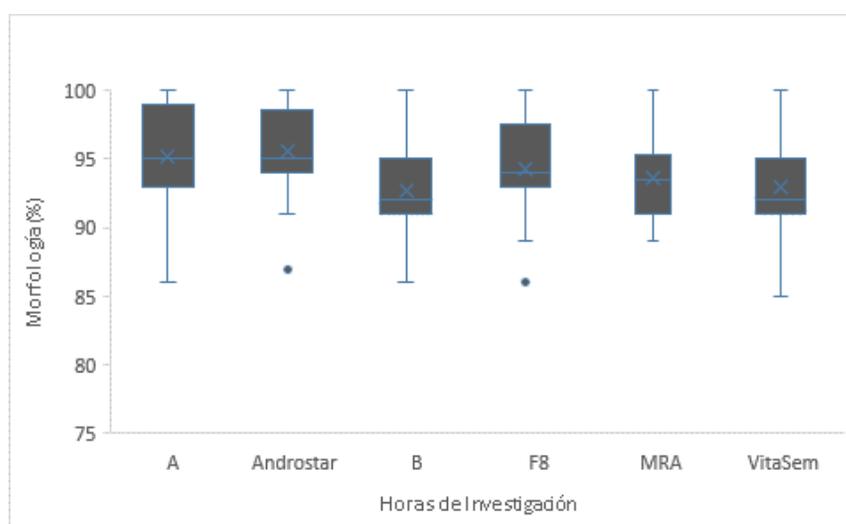
#### 4.5 Morfología Espermática

Al evaluar las características morfológicas de los espermatozoides en la tabla 4, se observa que no existen diferencias significativas en ninguno de los medios diluyentes utilizados. Además, se puede observar en la siguiente figura que durante el pasar de las horas el parámetro evaluado de morfología espermática presenta un gran porcentaje de estructuras sin morfoanomalías lo cual indica que no hay diferencias significativas con el paso del tiempo. (Ver figura 13).



**Figura 13. Distribución de los datos de morfología espermática según el tiempo de conservación de semen.**

A continuación, se observan los intervalos normales para el parámetro de morfología espermática frente a los medios diluyentes de conservación utilizados durante 72H, no existen diferencias estadísticas pero si a nivel visual (ver figura 14).



**Figura 14. Interpretación de los datos de morfología espermática según el diluyente de conservación de semen evaluado**

#### 4.6 Análisis Económico de los Diluyentes

A pesar de que existen algunas diferencias en los parámetros evaluados que hacen parte de los objetivos del presente estudio, se incluyen datos adicionales donde se pudo evidenciar que existen grandes diferencias en el análisis económico; acceso al diluyente (A y B) de fácil elaboración y obtención como se observa en la tabla 5, caso contrario sucede con los medios comerciales que se necesita previa solicitud y espera entre 2-4 días para la entrega.

**Tabla 5. Costos para la preparación de los diluyentes alternativos (A y B) en Cúcuta**

Material	Medida encontrada	Valor $\bar{x}$	Dosificación (gr)		Valor por dosis a utilizar(\$)	
			A	B	A	B
Glucosa	500 gr	\$16.300	50	40	1.630	1.304
Citrato de sodio	500 gr	\$5.600	3.5	3.5	40	40
Bicarbonato de sodio	500 gr	\$1.900	1.25	1.25	5	5
EDTA	500 gr	\$7.400	3.5	3.5	52	52
Penicilina 1.200.000 UI	Unidad	\$3.500	1	1	3500	3500
Agua destilada	Litro	\$4.100	1	1	4100	4100
<b>TOTAL</b>					<b>\$9.327</b>	<b>\$ 9.001</b>

Precios obtenidos según cotización en distribuidores de químicos en Cúcuta - 2020.

En términos económicos los diluyentes alternativos promedian un valor de \$9.164, por lo tanto hay una diferencia de \$6.311 menos que el valor promedio de los diluyentes comerciales que oscila en \$15.475(Tabla 6).

**Tabla 6. Comparación de medios alternativos y comerciales para la obtención de un 1 litro de diluyente**

<b>Diluyentes</b>	<b>Tempo de conservación</b>	<b>Acceso al medio</b>	<b>Valor total</b>
A	3 días	fácil	\$9.327
B	3 días	fácil	\$9.001
MR-A®	6 días	Solicitud	\$15.300
Vitasem®	6 días	Solicitud	\$14.200
Androstar ® Plus	7 días	Solicitud	\$17.450
F8®	8 días	Solicitud	\$14.950

Datos recopilados según estudio.

## 5. Discusiones

En el presente estudio fueron analizados dos verracos de alta genética, con excelente condición corporal, edades aceptadas para ser reproductores (> 8 meses), optimo plan sanitario, lo cual se evidencia por el alto porcentaje de espermatozoides vivos, con una buena motilidad espermática (>74%), obtenidos en los eyaculados frescos y refrigerados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se pudo demostrar que las células espermáticas evaluadas en este estudio son sensibles a la injuria normal por el detrimento del tiempo y se observa como los diferentes componentes de cada uno de los diluyentes evaluados colaboran para preservar las células espermáticas frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño causado por la disminución de la temperatura, de manera que cada diluyente busca conservar el material genético (Gadea, 2003).

La temperatura adecuada para la conservación seminal en porcinos es de 16 grados centígrados (°C), cómo lo reporta Torres *et al.* (2014), ya que temperaturas inferiores a ellas (<14°C y >20°C), presentan alteraciones tanto en la membrana del espermatozoide, como una disminución de la vitalidad espermática (Cuenca & Avellaneda. 2017). Aunque es importante aclarar que todo eyaculado en porcinos así se garantice la temperatura de conservación a 16 °C, va causando una disminución fisiológico gradual que se pudo observar en los parámetros de la motilidad individual y vitalidad, a medida que pasaron las horas de evaluación desde la hora 2 hasta las 72 (Zeng *et al.*, 2014).

El presente trabajo enfrente a las células espermáticas porcinas con medios de conservación de diferente elaboración y a su vez, una disminución de temperatura, en tiempos prolongados. Este almacenamiento conllevó un detrimento bioquímico y funcional que se expresa en la

mortalidad gradual del espermatozoide (Bielas *et al.*, 2017). Se debe tener presente que la conservación espermática es una técnica que consiste en mantener a las células reproductoras a una baja temperatura sin perder su integridad y calidad seminal, y que tiene como objetivo inhibir la actividad metabólica de la célula garantizando su vitalidad y funcionalidad a través del tiempo, para permitir su motilidad por el tracto uterino y lograr su reacción acrosómica antes de su encuentro con el ovocito.

La motilidad espermática es un parámetro de actividad metabólica e integridad de las membranas (Lossada, 2013). En el presente estudio los valores de movilidad de las células espermáticas estudiadas en el diluyente alternativo (B) es muy similar a los datos demostrados en diferentes estudios de los medios comerciales (Pinto *et al.*, 2013), sin embargo difieren mucho de los datos obtenidos con el medio MRA®, especulando problemas con el lote del medio, el plasma seminal de los machos evaluados, la temperatura ambiente, el agua para la preparación del medio, que pudieron afectar la eficiencia del diluyente.

Por otro lado, la presencia de glucosa como la única fuente de energía y el bajo contenido de oxígeno en el recipiente donde es disuelto y refrigerado el semen, estimula el metabolismo glucolítico (la ruta metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula), consecuentemente el pH intracelular del espermatozoide aumenta reduciendo su motilidad, es por ello que se observa la reducción en el parámetro de vitalidad, progresividad y linealidad espermática (Quintero *et al.*, 2009).

De la misma forma, los diluyentes comerciales poseen otros componentes no registrados diferentes a los que se reportan bibliográficamente, es por ello que estos componentes no reportados colaboran a darle mejor resistencia a la membrana plasmática del espermatozoide y a

soportar condiciones adversas, caso contrario los diluyentes alternativos (A y B) que tienen los requerimientos mínimos de conservación (Ochoa & Ortega, 2008), teniendo en cuenta que en la investigación para los parámetros ambientales y fisiológicos de los reproductores no mostraron diferencias muy marcadas con los índices evaluados con respecto a los medios comerciales.

En relación a los porcentajes de vitalidad y morfología de los espermatozoides evaluados, los resultados referidos a las células vivas mostraron algunas diferencias reportadas para las horas de investigación resultados más acertados al medio F8®, con respecto a los medios alternativos estadísticamente quien presentó mejor rendimiento fue el medio B, gracias a la protección dada por sus componentes al preservar los procesos fisiológicos detrimentales propios de las células espermáticas mantenidas en periodos de refrigeración (Roa *et al.*, 2005). Además, la morfología espermática es un indicador en la funcionalidad seminal debido a que los cambios internos generados en el acrosoma espermático son muy dicientes a las afecciones del medio donde ellos se encuentran (Czubaszek *et al.*, 2019).

El efecto de la refrigeración en semen de verraco ha sido ampliamente debatido por Ochoa y Ortega, (2008), Lossada, (2013), Pinto *et al.* (2013), Torres *et al.* (2014), Bielas *et al.* (2017), ya que existen diferencias en las composiciones bioquímicas de la membrana plasmática de los espermatozoides provenientes incluso del mismo verraco en diferente eyaculado, están involucradas en la sensibilidad de los espermatozoides a los procesos de refrigeración (Karunakaran *et al.*, 2017). Algunos estudios han demostrado que los cambios fisiológicos en los espermatozoides son producto de la capacitación acrosomal principal razón de daño de las células seminales cuando son sometidas a un shock térmico por frío, así que depende mucho de las características bioquímicas de los diluyentes ya que cumplen un papel importante en la vitalidad del semen expuesto a temperaturas durante periodos de tiempo prolongados (Schulze *et al.*,

2018).

Es importante traer a contexto el análisis económico, que es uno de los pilares técnicos que se deben tener en cuenta en el proceso de reproducción porcina, cabe destacar que en el conocimiento de la fisiología espermática los componentes para la formulación de dichos diluyentes alternativos deben ser evaluados desde el costo – beneficio y así contrarrestar uno de los principales problemas que agobian a los pequeños productores, lo cual es el acceso debido al alto valor económico que representan los medios comerciales en la región, por ese motivo se logró hacer una comparación entre los diluyentes alternativos y los comerciales.

## 6. Conclusiones

La técnica de dilución del semen de verraco con dos diluyentes alternativos a 16°C por 72 horas, no afectó de manera significativa los parámetros evaluados para la capacidad de avance progresivo (motilidad) de los espermatozoides a través del tiempo de refrigeración, al ser comparados con los diluyentes comerciales, se pudo observar que las cifras obtenidas no comprometen la calidad seminal y se mantienen dentro de unos rangos óptimos.

Este trabajo en el que se ponen a prueba dos diluyentes alternativos a 16°C por 72 horas no afectó de manera significativa la mayoría de los parámetros para determinar el porcentaje de sobrevivencia espermática a través del tiempo de evaluación en comparación con los diluyentes comerciales.

Al utilizar los dos diluyentes alternativos a 16°C por 72 horas en este presente estudio, no se vieron afectados de manera significativa la integridad estructural de los espermatozoides a través del tiempo de refrigeración, al ser comparada con los datos obtenidos de los medios comerciales ya que no existieron diferencias significativas.

Con respecto a los resultados obtenidos de los medios alternativos a nivel general, el diluyente B, obtuvo mejores resultados que el diluyente A, aunque los datos se encuentran en un rango estrecho, por tal motivo para este estudio la mejor opción a la hora de utilizar un medio de dilución alternativo sin lugar a duda será la formulación B ya que da mejores resultados y a su vez es el más económico de todos.

Se logra concluir que en el presente estudio los parámetros de motilidad y vitalidad reportan diferencias estadísticas significativas, aunque es importante referenciar que para un contexto

literario e incluso de parámetros de eficiencia reproductiva en campo son aceptados y no interfieren de manera negativa en la investigación de los seis diluyentes evaluados haciendo reseña al estudio de los dos medios alternativos de elaboración para el trabajo, realizados por el equipo investigador. Además, existe gran diferencia en un contexto más práctico ya que los medios alternativos tienen ventaja sobre los comerciales por ser más económicos, de fácil acceso y elaboración, ayudando a los pequeños productores a tener avances en la región y a su vez, mejorar la calidad de vida por medio de biotecnologías reproductivas aplicadas.

Al evaluar cada uno de los datos obtenidos y al comparar los resultados podemos observar esa capacidad de preservación y conservación de material genético refrigerado por parte de los diluyentes alternativos que en algunos aspectos poseen mejores bondades que los medios ya utilizados en el mercado comercial cumpliendo con la justificación de este estudio y dando un aporte significativos a la región y la ciencia.

## 7. Recomendaciones

Aunque han surgido avances en casi un siglo que lleva las técnicas de inseminación artificial porcina y conservación de material genético, el conocimiento de estos procesos aún es muy limitado, así que es importante profundizar en el estudio, diseño y elaboración de esos nuevos diluyentes de fácil acceso y económicos, con el ánimo de apoyar los pequeños productores de la región.

Con base a este estudio nos damos cuenta que el principal objetivo de la producción porcina es garantizar la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad, y de esta manera poder validar todos los resultados obtenidos bajo parámetros de eficiencia reproductiva en las granjas porcinas de la región.

Realizar nuevos estudios, con células espermáticas porcinas, haciendo ajustes pertinentes a los medios de conservación con el ánimo de garantizar mayor preservación de material genético en dichos medios cambiando la formulación en cantidades o agregando un nuevo producto que proteja con más rigurosidad la membrana espermática, para tener un referido de comparación, con las mismas tinciones y procesos usados en esta investigación.

Según algunos reportes de estudios sobre congelación de semen porcino, es importante hacer mención, que su estructura morfológica no resiste grandes cambios de temperatura, ni una refrigeración constante inferior a los 14°C pues está claro que inicia su deterioro, pero se ha logrado realizar estudios aunque costosos de conservación por mayor tiempo para transporte de dosis de semen en largas distancias, Conservación de genética, Seguridad sanitaria, pero en la actualidad se puede exponer una variante con un precio más bajo.

### Referencias Bibliográficas

- 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.  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292006000300005>
- Alm, K., Peltoniemi, O., Koskinen E. & Andersson, M. (2006). Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reprod. Domest. Anim*, 41(2), 210-213.
- Althouse, G. & Lu, K. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63(6), 573-584.
- Bamba, K. (1988) Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*, 29(4), 1245-1251.
- Bielas, W.; Nizański, W.; Partyka, A.; Rząsa, A. & Mordak, R. (2017). Effect of long-term storage in Safe Cell+ extender on boar sperm DNA integrity and other key sperm parameters. *Acta Vet Scand*, 59(4), 58. DOI 10.1186/s13028-017-0325-9
- Boersma, A., Raúhofer, R. & Stolla, R. (2001). Influence of Sample Preparation, Staining Procedure and Analysis Conditions on Bull Sperm Head Morphometry using the Morphology Analyser Integrated Visual Optical System. *Reprod Dom Anim*, 36(9), 222-229.
- Broekhuijse, L., Sostaric, E., Feitsma, H. & Gadella, B. (2011). Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci*, 4(90), 779-89.

- Córdova, A.; Pérez, J.; Méndez, W.; Villa, A. & Huerta, R. (2015). Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Rev vet*, 26(1), 69-74.
- Córdova, I.; Muñoz, R.; Córdova, S.; Córdova, A. & Pérez, F. (2005). Características del semen de verraco y su evaluación práctica. Universidad Autónoma del estado de México. *Ciencia Ergo Sum*, 12(3), 271-274.
- Cuenca, M. & Avellaneda, J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(9), 1-11.
- Czubaszek, M; Andraszek, K; Banaszewska, D. & Walczak, R. (2019). The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. *PLoS ONE* 14(3), 214-243.
- Fondo Nacional de la Porcicultura. (2017). *Informe Gestión Año 2017*. Bogotá: FNP.
- Fraser L., Gorszczaruk K. & Strzezek J. (2001) Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim*, 5(36), 325-329.
- Frydrychová, S., Čerovský, J., Lustyková, A. & Rozkot, M. (2010) Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech J. Anim. Sci*, 4(55), 160–166.
- Gadea, J. (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(41),17-27. 10.5424/sjar/2003012-17.

Gerrits, R., Lunney, J., Johnson, A., Pursel, V., Kraeling, R., Rohrer, G. & Dobrinsky, J. (2005).

Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*, 63(8), 283-299.

Gil, M; Garcia, M; Baron, J; Aparicio, I; Santos, A. & Garcia, L. (2009) Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71(56), 254-263.

Hafez, B. (2003). *Preproduction in farm animals*. USA: Baltimore. Editorial Seventh.

Henning, H., Petrunkina, A., Harrison, R. & Waberski, D. (2009) Changes in responsiveness to bicarbonate under capacitating conditions in liquid preserved Boar spermatozoa in vitro. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*, 66(5), 79-80.

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2019) *Informe de gestión*.

Recuperado de: [http://www.ideam.gov.co/web/atencion-y-participacion-ciudadana/transparencia-y-acceso-a-informacion-publica/informes-de-gestion/-/document\\_library\\_display/vI9N5o33W7J5/view/91010626](http://www.ideam.gov.co/web/atencion-y-participacion-ciudadana/transparencia-y-acceso-a-informacion-publica/informes-de-gestion/-/document_library_display/vI9N5o33W7J5/view/91010626).

Karunakaran, M.; Chakurkar, E.; Ratnakaran, U.; Naik, P.; Mondal, M. & Mondal, A. (2017).

Characteristics of boar semen preserved at liquid state. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 217-220, DOI: 10.1080/09712119.2016.1150848

Knox, R., Levis, D., Safranski, T. & Singleton, W. (2008) An update on North American boar stud practices. *Theriogenology*, 70(4), 1202-1208.

Kondracki, S. (2003) Breed differences in semen characteristics of boars used in artificial insemination in Poland. *Pig News and Information*, 2(4), 11-122.

- Lossada, M. (2013). *Evaluación de dos diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino bajo condiciones de refrigeración*. Tesis Maestral. Universidad del Zulia, Venezuela.
- Madrid, B. (2003). *Evaluación de la aptitud reproductiva del toro*. *Reproducción Bovina. C. Gonzalez-Stagnaro*. Maracaibo, Venezuela: Astrodata SA. Fundación GIRARZ. Cap. XVI: 263-278.
- Martin, D., Barón, A., Bragado, A., García, L. & Gil, M. (2013) Inter and intra breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and Duroc boar semen during longterm storage in MR-A and XCell extenders. *Anim Reprod Sci*, 139(7), 109-114.
- Martínez, E.; Vázquez, M.; Matas, C.; Roca, J.; Coy, P. & Gadea, J. (1993) Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenol*, 40(8), 547-557.
- Medrano, A., Fernandez J., Ramió, L., Alvarez, J., Goldberg, E. & Rivera, M. (2006). Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Develop*, 73(6), 369-378.
- Noakes, E., Parkinson, G. & England, W. (2001). *Arthur Veterinary Reproduction and Obstetrics*. London: W Saunders.
- Ochoa, G. & Ortega, R. (2008). Evaluación in vitro e in vivo de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 15(4), 298-306. Recuperado de:  
<https://pdfs.semanticscholar.org/dd82/37fa67553f02ac92bde5273b1f95d3352fae.pdf>

- Pinto, F; Caicedo, C; Almentero, J. Linares, V. & Vergara, L. (2013) Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. - Viability of Porcine Semen Preserved With MRA® Diluent. *Revista Científica, FCV-LUZ* , 13(3), 206- 210.
- Polge, C. (1956). Artificial insemination of pigs. *Veterinary Record*, 68(42), 62-76
- Quintero, A., González, D., Garde, J., Estesó, M., Fernández, M. & Carvalho, J., (2009). Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. *Rev. Científ. FCV-LUZ*, 19(2), 153-156.
- Riesenbeck, A. (2011) Review on international trade with boar semen. *Reprod. Domest. Anim*, 46(5), 1-3.
- Roa, A., Tamasaukas, R., Silva, A. & Sánchez, J. (2005). Criopreservacion de semen suino en venezuela. Una revisión. Cryopreservation boar semen in Venezuela. *REDVET*, 6(12), 117-332.
- Roca, J., Vazquez, J., Gil, M., Cuello, C., Parrilla, I. & Martinez E. (2006) Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim*, 41(2), 43-53.
- Rueda, M., Perdigón, R., Arias, T., Mendoza, D., Benítez, J. & Lemus, C. (2009). Impacto técnico y productivo del diluyente de semen porcino DICIP-M en condiciones cubanas de producción comercial de cerdos. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 16(1), 1-22.
- Rugeles, C., Caicedo, R., Almentero, C., Linares, J. & Vergara, O. (2013). Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. Nota técnica. *Revista Científica*, 19(3), 206-210.
- Recuperado de: <http://www.redalyc.org/html/959/95926665007/>

- Schulze, M.; Kusterb, C.; Schäfera, J.; Junga, M. & Grossfeldc, R. (2018). Effect of production management on semen quality during long-term storage in different European boar studs. *Animal Reproduction Science*, 190(18), 94-101.
- Torres, P.; Fischman, M; Acerbo, M; García, C; Míguez, M. & Dominguez, J. (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días: resultados preliminares. *Arch. Zootec*, 63(243), 14-36
- Tsakmakidis, I; Lymberopoulos, A. & Khalifa, T. (2010) Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J. Vet. Sci*, 11(1), 151-154.
- Van Der Horst, G. & Maree, L. (2009) SpermBlue: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *B Biotech Histochem*, 84(6), 299-308.
- Vertegen, J., Iguer, M. & Onclin, K. (2002) Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(5), 149-179.
- Vyt, P. (2007). Examination and storage of liquid porcine semen. *Veterinary Medicine, Merelbeke Ghent University*, 5(8), 78-90.
- Waberski, D., Petrunkina, A & Topfer, E. (2008) Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology*, 70(2), 1346-1351.
- Waterhouse, K, De Angelis, P., Haugan, T., Paulenz, H., Hofmo, O. & Farstad, W. (2004) Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Therionogenology*, 62(1), 1638–1651.

Zeng, C.; Peng, W.; Ding, L.; He, L.; Zhang, Y. & Fang, D. (2014). A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, 69(1), 119-127.

Recuperado de:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224014001242?via%3Dihub>

Zhu, W. & Liu, X. (2000) Cryodamage to plasma integrity in head and tail región human sperm.

*Asian J. Androl*, 2(4), 135-138.

**ANEXOS**

**Anexo 1. Registro fotográfico de la población de verracos estudiada**

1.1. Reproductor #1 (SANSON).



1.2. Reproductor #2 (MAX).

## Anexo 2. Materiales y equipos utilizados



2.1. Materiales utilizados.



2.2. Equipos utilizados.

### Anexo 3. Diluyentes utilizados durante la investigación



3.1. Diluyentes comerciales.



3.2. Diluyentes alternativos.

#### Anexo 4. Muestra colectada y evaluación de la concentración espermática

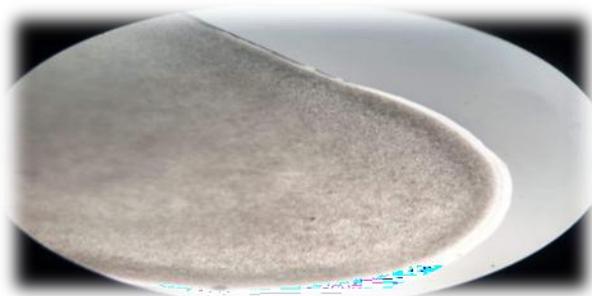


4.1. Eyaculado recién colectado.

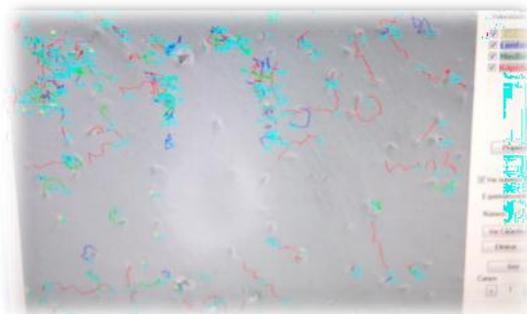


4.2. Calculo de concentración espermática.

## Anexo 5. Evaluación de la capacidad de avance progresivo por medio del ISAS

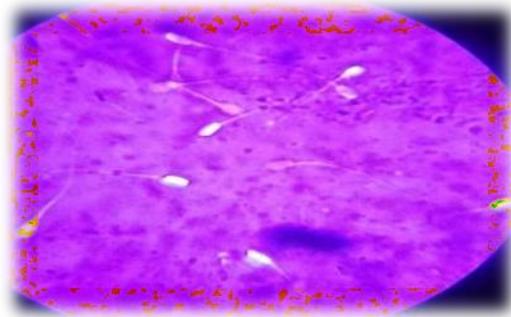


5.1. Motilidad masal.



5.2. Evaluación de la motilidad ISAS.

## Anexo 6. Evaluación de la sobrevivencia espermática



6.1. Tinción Eosina-Nigrosina.

6.2. Vista microscopio a 100x (Vivos-Muertos).

## Anexo 7. Evaluación de las estructuras morfológicas de las células, objeto de estudio



7.1. Montaje de la muestra.



7.2. Morfoanomalías.