

**RELACIÓN DE UNA PRUEBA DE FUNCIÓN Y RESISTENCIA ESPERMÁTICA CON  
LA TASA DE NO RETORNO A CELO EN CERDAS**



**José Fabián Páez Castiblanco**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Bogotá, Colombia 2022**

**RELACIÓN DE UNA PRUEBA DE FUNCIÓN Y RESISTENCIA ESPERMÁTICA CON  
LA TASA DE NO RETORNO A CELO EN CERDAS**



**José Fabián Páez Castiblanco**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;**

**Médico Veterinario**

**Director**

**Julián Valencia Giraldo. MV, PhD**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Bogotá, Colombia, 2022**

<b>1</b>	<b>Contenido</b>	
<b>2</b>	<b>TABLAS.....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
6.1	OBJETIVO GENERAL .....	11
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>7</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
7.1	CONTEXTO DE LA PRODUCCIÓN PORCINA EN COLOMBIA .....	12
7.1.1	<i>Aparato reproductor de la cerda.....</i>	<i>13</i>
<b>8</b>	<b>CICLO ESTRAL DE LA CERDA .....</b>	<b>16</b>
8.1	METAESTRO.....	16
8.2	DIESTRO .....	16
8.3	PROESTRO.....	16
8.4	ESTRO.....	17
8.5	GESTACIÓN EN LA CERDA .....	18
<b>9</b>	<b>INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CERDAS.....</b>	<b>18</b>
9.1	INSEMINACIÓN CERVICAL O STANDARD (SAI) .....	18
9.2	INSEMINACIÓN INTRAUTERINA PROFUNDA (DUI).....	19
<b>10</b>	<b>PASOS PARA LA APLICACIÓN DEL SEMEN.....</b>	<b>19</b>
<b>11</b>	<b>MÉTODO DE DETECCIÓN DE CELO EN CERDAS.....</b>	<b>22</b>
11.1	PRECELO TIEMPO ANTES DEL CELO SE CARACTERIZA POR: .....	22
11.2	CELO O TIEMPO DE CELO VERDADERO.....	23
11.3	POST CELO O TIEMPO DESPUÉS DEL CELO .....	24
<b>12</b>	<b>APARATO REPRODUCTOR DEL CERDO.....</b>	<b>25</b>
12.1	COLA DEL EPIDÍDIMO .....	25
12.2	CORDONES ESPERMÁTICOS .....	25
12.3	CONDUCTO DEFERENTE.....	25
12.4	GLÁNDULAS VESICULARES .....	26
12.5	PRÓSTATA.....	26
12.6	GLÁNDULAS BULBO URETRALES.....	26
12.7	GLÁNDULAS GENITALES ACCESORIAS.....	26

12.8	PENE.....	26
12.9	PILARES DEL PENE .....	27
12.10	PREPUCIO.....	27
<b>13</b>	<b>FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO.....</b>	<b>28</b>
13.1	ESPERMATOGENESIS .....	28
<b>14</b>	<b>MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN.....</b>	<b>29</b>
14.1	MANUAL.....	29
14.2	VAGINA ARTIFICIAL.....	30
14.3	TRANSPORTE DEL SEMEN .....	30
<b>15</b>	<b>GENERALIDADES DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO .....</b>	<b>30</b>
<b>16</b>	<b>PROCESO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....</b>	<b>32</b>
16.1	CABEZA .....	33
16.2	FLAGELO .....	34
16.3	CAMBIOS DURANTE LA CAPACITACIÓN .....	34
16.4	PÉRDIDA DE LOS FACTORES DESCAPACITANTES .....	35
<b>17</b>	<b>PRUEBA DE EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE .....</b>	<b>36</b>
17.1	PRUEBA DE FUNCIÓN Y RESISTENCIA ESPERMÁTICA.....	36
<b>18</b>	<b>DILUYENTE.....</b>	<b>38</b>
18.1	TIPOS DE DILUYENTE .....	38
18.2	DILUYENTES DE CORTO PLAZO.....	38
18.3	DILUYENTES DE LARGO PLAZO .....	39
<b>19</b>	<b>PREDICCIÓN DE LA FERTILIDAD EN EL GANADO PORCINO .....</b>	<b>40</b>
19.2	ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
<b>20</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
20.1	TIPO DE ESTUDIO .....	43
20.2	LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.....	43
20.3	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	43
20.4	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	44
20.5	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	44
20.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	45
<b>21</b>	<b>PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>46</b>
21.1	DESARROLLO DE LAS PRUEBAS DE RESISTENCIA Y FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA	46
21.2	PRUEBA DE ESPERMATOZOIDES FUNCIONALMENTE COMPETENTES (EFC) .....	46

21.3	LA PRUEBA CONSISTIÓ EN UNA COMBINACIÓN DEL sHOST, MARCAJE CON PI/FITC-PNA Y FIJACIÓN CON SOLUCIÓN FORMOLADA .....	46
21.4	REACTIVOS .....	47
21.5	MATERIALES Y EQUIPOS .....	47
21.6	PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	48
21.7	PROCEDIMIENTO .....	48
21.8	OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO .....	50
21.9	PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA .....	50
<b>22</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>23</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>24</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>25</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>

## **2 Tablas**

TABLA 2. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES CONSIDERADAS EN EL ESTUDIO. ....	55
TABLA 3 RESULTADOS DE ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE LABORATORIO Y TASA DE NO RETORNO. ....	57
TABLA 4 MODELO DE REGRESIÓN PARA LA PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA ESPERMÁTICA A TRAVÉS DEL TEST HOST Y LA RELACIÓN CON LA TASA DE NO RETORNO .....	58
TABLA 5 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO DE REGRESIÓN PARA LA PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA ESPERMÁTICA .....	58
TABLA 6 MODELO DE REGRESIÓN PARA LA PRUEBA DE ESPERMATOZOIDES FUNCIONALMENTE COMPETENTES Y LA RELACIÓN CON LA TASA DE NO RETORNO. .	59
TABLA 7 Y 5 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO DE REGRESIÓN PARA LA PRUEBA DE ESPERMATOZOIDES FUNCIONALMENTE COMPETENTES .....	59

### 3 Resumen

El presente estudio se centró en establecer el valor predictivo de dos pruebas de resistencia y funcionalidad espermática sobre la tasa de no retorno pos-inseminación artificial en porcinos, en búsqueda de una prueba de laboratorio de utilidad a nivel comercial. En tres granjas ubicadas en los departamentos de Cundinamarca, Caldas y Cauca, se obtuvieron 14 eyaculados provenientes de diferentes machos, para realizar análisis en laboratorio de una dosis comercial y realizar inseminación artificial con el resto de dosis producidas para evaluar presencia de celo 18 a 22 días pos-inseminación. Se desarrolló una prueba de laboratorio que consistió en determinar la morfología, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica mediante marcaje con yoduro de propidio y aglutinina de cacahuete de *Arachis hypogaea* ligado a isotiocianato de fluoresceína (PI /FITC-PNA, del nombre en inglés) después de estrés hipoosmótico, en búsqueda de una población élite de espermatozoides funcionalmente competentes (EFC). Adicionalmente se hizo por separado una prueba de funcionalidad de membrana o test de hinchazón hipoosmótica. Se realizó análisis de correlación y de regresión. Hubo una correlación moderada-alta y significativa ( $P < 0,05$ ) entre los EFC ( $r = 0,633$ ) y entre la funcionalidad de membrana ( $r = 0,710$ ) con la tasa de no retorno al celo. Además, se probó el valor predictivo de las dos pruebas sobre la tasa de no retorno mediante modelo de regresión con un R cuadrado de 0,401 y 0,504, respectivamente. Como conclusión, las dos pruebas de laboratorio realizadas presentaron un valor predictivo moderado de la fertilidad del semen medido a través de la tasa de no retorno, lo cual, debido a la gran

cantidad de factores que intervienen en este proceso, las técnicas tienen un alto impacto a nivel comercial para el uso adecuado del semen.

**Palabras clave:** *funcionalidad espermática, fertilidad in vivo, calidad seminal*

#### **4 Introducción**

La eficiencia reproductiva es un parámetro clave para mantener la rentabilidad de las granjas porcinas, y aunque, en la mayoría de estudios de investigación se centra la atención en evaluar los factores asociados a la hembra, el macho repercute en mayor proporción sobre los resultados finales, puesto que es posible inseminar una gran cantidad de cerdas con un solo eyaculado (Gadea, 1997).

Mantener una evaluación constante de la calidad seminal que permita predecir la capacidad de los espermatozoides de fecundar los ovocitos *in vivo* es un constante desafío para los porcicultores y la ciencia; la diferencia entre los eyaculados de los verracos radica en la capacidad de fertilizar y dichas características han sido ampliamente reportadas en la búsqueda de poder reducir los costos a los pequeños y grandes porcicultores. En diferentes estudios se ha evaluado la capacidad de predicción de la fertilidad en campo que tienen las pruebas de laboratorio con resultados poco prometedores, llegando a la conclusión que las pruebas que tienen mayor poder predictivo son las que miden el proceso de fecundación *in vitro* de los espermatozoides (Ruiz-Sánchez et al., 2006; Gadea, 1997). Sin embargo, la realización de estas pruebas acarrea grandes costos y personal altamente capacitado, razón por la cual, es necesaria la

búsqueda de tests de laboratorio económicos con alto valor predictivo (Pérez-Llano et al., 2009).

La composición y las propiedades de la membrana plasmática protegen los componentes intracelulares, manteniendo el volumen celular, ya que el agua se mueve de un ambiente de baja concentración de soluto (solución con baja osmolaridad), hacia un ambiente de alta concentración de soluto (solución con alta osmolaridad), debido al transporte de agua a través de la membrana bajo el gradiente de concentración de iones y osmolitos; siendo estas características importantes para la capacitación de los espermatozoides, la reacción del acrosoma y la unión entre gametos (Valencia et al., 2019). Un sistema de regulación es necesario para que los espermatozoides se adapten a los cambios de osmolaridad durante su transporte a través del aparato reproductor del verraco, durante la manipulación de los espermatozoides debido a su exposición a los diferentes cambios osmóticos y remodelación de membrana. Al momento en que se deposita el semen en el tracto reproductivo de la cerda, los espermatozoides encuentran variaciones hipotónicas en el medio contiguo ya que provienen de un medio hipertónico (430 mOsm/Kg), y en la cola del epidídimo, en el plasma seminal y en el líquido uterino están en un medio isotónico 290-300 mOsm/Kg (Shelford et al., 2022). Lo cual podemos determinar que la resistencia osmótica de los espermatozoides y el poder mantener su volumen celular, integridad funcional son determinantes a la resistencia osmótica (ORT) e hinchazón hipo osmótica (HOST) (Valencia et al., 2019). De acuerdo a lo anterior el objetivo del presente estudio es establecer el valor predictivo de dos pruebas de resistencia y funcionalidad espermática después de someter a los espermatozoides a estrés

hipoosmótico sobre la tasa de no retorno pos-inseminación artificial en porcinos, en búsqueda de una prueba de laboratorio de utilidad a nivel comercial.

## **5 Justificación**

En Colombia durante las últimas décadas el gremio porcicultor se ha visto en la necesidad de mejorar las biotecnologías reproductivas presentes para entregar más producción de animales para beneficio, debido a la gran demanda del mercado nacional e internacional; ya que la calidad es excelente, se hace indispensable que desde la granja productora se lleve a cabo una buena selección de machos reproductores (verracos), con unos buenos índices reproductivos. La selección debe ser realizada entre las mejores progenies de los verracos probados y las hembras superiores dentro de cada raza. En países en donde se realizan las pruebas de progenie, el período de prueba cubre el intervalo entre los 20 a 100 kg de peso en los cerdos a ser probados (Mazzarri, 1984). Por consiguiente se tienen los siguientes aspectos a tener en cuenta a la hora de seleccionar un verraco para cubrir las cerdas son: la tasa de crecimiento, tasa de conversión alimenticia, medida ultrasónica del espesor de la grasa dorsal, calidad de los aplomos. Los verracos seleccionados son entonces entrenados para montar maniqués, para extraer el semen y estudiar la calidad y cantidad espermática así como la fertilidad son criterios de selección recomendados (Torrentes et al., 2013). La conservación y almacenamiento del semen deben permanecer aproximadamente 90 minutos a temperatura de 20°C, luego deben almacenarse en una caja de aire acondicionado. El rango ideal de temperatura de almacenamiento se sitúa entre 16°C y 18°C. A esta temperatura el metabolismo

espermático y el consumo de nutrientes se reducen, conservando la anaerobiosis(Torrenes et al., 2013), para su posterior transporte y inseminación artificial (IA) en cerdos. Es una tecnología de reproducción asistida muy eficaz utilizada en más del 90% de las cerdas en los principales países productores de carne de cerdo. El principal beneficio de la IA en especies de animales domésticos se ve en la prevención de la transmisión de enfermedades venéreas y mejorar la genética(Waberski et al., 2019) existente en las granjas productoras de carne de cerdo en el país, por ende se hace indispensable contar con hembras con fertilidad comprobada en las granjas de cría las cuales nos darán un factor de seguridad al momento de IA y Subsecuentemente nos enfocarnos en un completo análisis del material genético obtenido de los verracos de las diferentes granjas, brindando calidad en la aplicación de las tecnologías existentes y las nuevas, que se puedan brindar dentro de cada instalación productora de la ganadería porcina.

## **6      Objetivos**

### 6.1    Objetivo general

- Establecer el potencial uso de una prueba de función y resistencia espermática in vitro como predictor de la tasa de no retorno a celo en porcinos

### 6.2    Objetivos específicos

- Establecer si hay relación entre la resistencia espermática y funcionalidad de membrana del espermatozoide porcino con la repetición de celo en cerdas bajo un sistema de inseminación artificial
- Desarrollar la prueba de laboratorio de espermatozoides funcionalmente competentes que permita evaluar la resistencia de la membrana del espermatozoide, la morfología y la funcionalidad de membrana de los espermatozoides de porcino.

## **7 Marco teórico**

### **7.1 Contexto de la producción porcina en Colombia**

El contexto colombiano de la producción de carne de cerdo. En Colombia según las cifras consolidadas por el departamento administrativo nacional de estadística - DANE, Entre 2010 y 2021 el consumo de cerdo per cápita creció 155,7% y, según los datos de Porkcolombia, la ingesta de esta proteína ya supera, en promedio, los 12,2 kilos por cada consumidor. Sin desestimar que los costos de la carne también siguen incrementando por la devaluación que tiene un efecto directo para la porcicultura, dado que el principal insumo para la actividad es el alimento balanceado, que se produce a partir de materias primas importadas como el maíz y la soya, y pesan un 75 % en los costos de producción. A esto se sumó la crisis de fletes marítimos y logística de la cual aun el día de hoy se ve reflejado en todos los insumos agropecuarios.

En cuanto a la producción nacional de carne de cerdo en 2021 ascendió a 491.233 toneladas, registrando un crecimiento del 4,9 %, que corresponde a una oferta adicional de 22.805 toneladas. Esta tendencia viene desde 2010 y consolida a la porcicultura como una de las principales actividades agropecuarias y económicas a nivel nacional. Por eso se hace de vital importancia, la aplicación de nuevas biotecnologías reproductivas en el gremio; ayudando a consolidarla como, una herramienta fundamental de los poricultores, que buscan mejorar las tecnologías existentes y aplicación de las nuevas. Dado que la producción de carne porcina es de ciclo corto, lo cual durante la última década ha despertado el interés de potenciales productores; ya que no se requiere de grandes extensiones de tierra para su desarrollo. Adicionalmente, aporta al aumento del

motor productivo del país, por sus altos estándares de calidad ofrecido en los subproductos de origen porcino.

### **7.1.1 Aparato reproductor de la cerda**

Los ovarios son bastante móviles, miden 5 cm de largo y se caracterizan por ser irregulares, con muchos folículos y cuerpos amarillos que sobresalen de su superficie. Están suspendidos entre los intestinos por largos meso ovarios. Cada uno de ellos está la mayoría de las veces unos pocos centímetros a lateroventral de la entrada pelviana (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

#### 7.1.1.1 Trompa uterina

Mide unos 20 cm de largo y empieza dentro de la bolsa ovárica en un gran orificio que mira el ovario. Corre sobre el mesosálpinx coniforme para continuarse con el cuerno del útero sin que haya ninguna constricción perceptible (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

#### 7.1.1.2 Cuerpo del útero

Es corto. Los cuernos continúan hacia adelante por unos centímetros dentro de un revestimiento común de músculo longitudinal, dando la impresión de que el cuerpo uterino es más largo de lo que realmente es. El músculo circular, más profundo, que está en la unión del cuerpo y los cuernos, forma un complejo esfínter que funciona de modo que cuando la entrada de un cuerno está cerrada, la otra se halla abierta (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

### 7.1.1.3 Cuernos uterinos

Son llamativos por su longitud. En el estado no grávido cada uno mide cerca de 1 metro de largo y en plena preñez esta longitud puede duplicarse con facilidad porque a veces cada cuerno contiene ocho o más fetos (Dyce, Sack, & Wensing, 1991). Los cuernos no grávidos y, para el caso, los ovarios son tan móviles que no se puede asignar ninguna posición exacta en la cavidad abdominal. Los cuernos están hacia craneal de la entrada de la pelvis, a mitad de camino entre el techo y el piso, suspendidos por unos extensos ligamentos anchos.

### 7.1.1.4 Arteria uterina

Vaso sustancial, es la principal proveedora de sangre del útero, el cual también recibe sangre de ramas de las arterias ováricas y vaginal

### 7.1.1.5 Vena ovaria

Drena la mayor parte del útero, además del ovario y trompa uterina, consiste en dos o tres vasos intercomunicados. Junto con ramas de la arteria de la arteria uterina, la arteria ovárica forma denso plexo en torno de los conductos venosos, permitiendo que las prostaglandinas luteolíticas procedentes del cuerno uterino lleguen al ovario homolateral (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

### 7.1.1.6 Cuello uterino

Es peculiar por su longitud de 25 cm y por la presencia de hileras de prominencias de mucosa que sobresalen dentro de la luz y se interdigitan para ocluir el conducto (Dyce, Sack, & Wensing, 1991). Sus extremos están mal definidos; el canal cervical simplemente

se ensancha en cada extremo para continuarse con el útero o con la vagina. Cerca de la mitad del cuello está dentro de la cavidad abdominal.

#### 7.1.1.7 Vagina

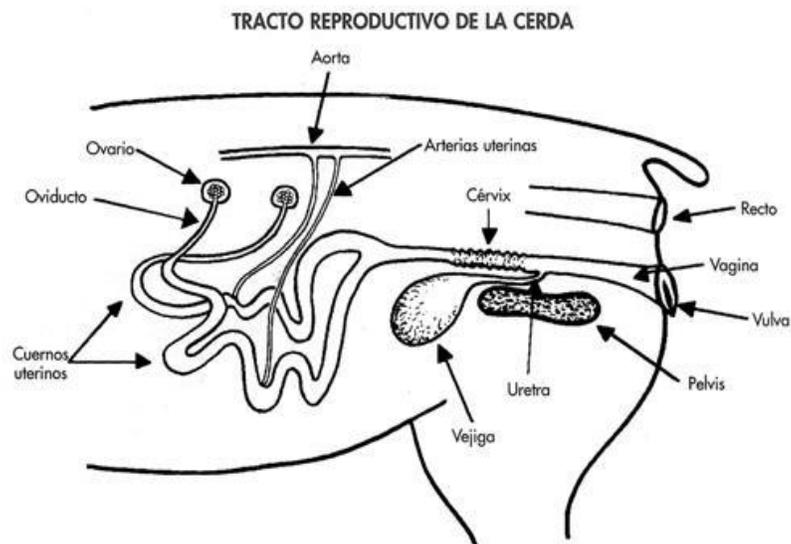
No representa particularidades.

#### 7.1.1.8 Vestíbulo

Es relativamente largo por que la uretra desemboca en el tracto genital en un sitio bastante craneal.

#### 7.1.1.9 Vulva

Es un tanto cónica y esta inclinada de modo que la hendidura mira en dirección dorso caudal



*Ilustración 1 Anatomía reproductiva de la cerda tomada de (Muirhead & Alexander, 2005)*

## **8 Ciclo estral de la cerda**

El ciclo estral en la cerda tiene una duración de 21 días, con un promedio de 18-24 días. Depende de la línea genética que se esté utilizando en las granjas. Debido a que la especie porcina es poliéstrica continua, los ciclos se pueden repetir siempre que no exista gestación, lactación, o efecto de alguna patología. El ciclo estral de la cerda comprende cuatro etapas: metaestro, diestro, proestro y estro (Galina & Valencia, 2008).

### **8.1 Metaestro**

Tiene una duración aproximada de 2 días y se caracteriza por la presencia de los cuerpos hemorrágicos, a partir de los cuales se comienzan a formar los cuerpos lúteos (Galina & Valencia, 2008).

### **8.2 Diestro**

Tienen una duración aproximada de 14 días. En este periodo, bajo el estímulo de la hormona LH, el cuerpo lúteo se reorganiza hasta alcanzar su desarrollo al día 12 a 14 del ciclo estral. Simultáneamente, los niveles de progesterona van en aumento hasta alcanzar un nivel (25-35 ng/ml) entre el día 10 y día 14 del ciclo estral (Galina & Valencia, 2008).

### **8.3 Proestro**

Tiene una duración de 2 a 3 días; sin embargo, su duración en cerdas primerizas se puede reducir hasta en un día. En esta etapa se lleva a cabo el proceso de crecimiento y maduración folicular. Para el día 16 a 21 del ciclo estral existe una gran cantidad de folículos entre 8 a 10 mm de diámetro poco antes de la ovulación (Galina & Valencia, 2008).

#### 8.4 Estro

Tiene una duración de 2 a 3 días, generalmente esta fase inicia en las horas de la madrugada.

Es la fase durante la cual la cerda es sexualmente receptiva al macho. Durante esta ocurre la maduración final de los folículos, los cuales alcanzan su mayor nivel esteroidogénico, produciéndose un pico preovulatorio de estrógenos (Galina & Valencia, 2008).

En esta etapa la porción interna de la vulva esta congestionada y húmeda por las secreciones de la vagina y de otros segmentos del aparato reproductivo (Galina & Valencia, 2008).

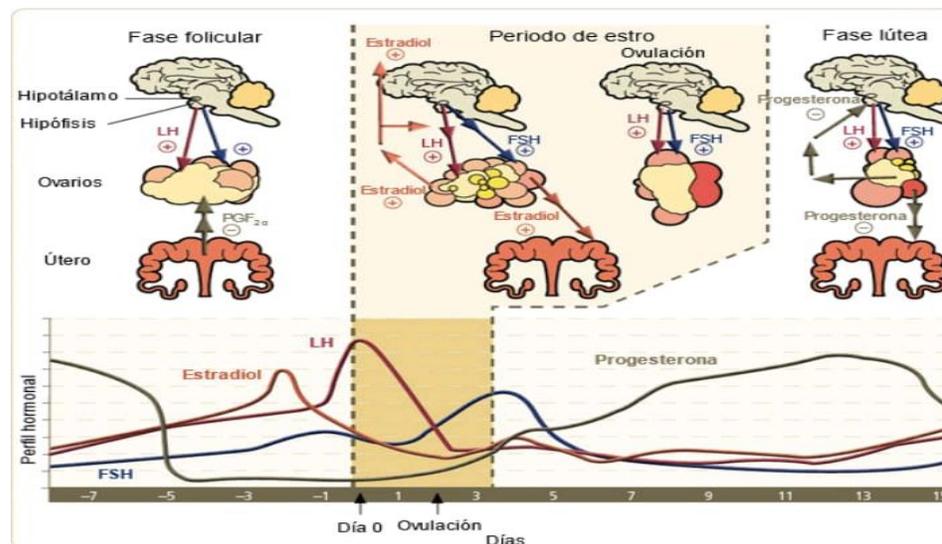


Ilustración 2 Ciclo estral de la cerda tomada de (Sánchez, 2013)

## 8.5 Gestación en la cerda

La duración de la gestación es de 114 días con un promedio de 110 a 120 días. Los niveles hormonales de progesterona producida por los cuerpos lúteos, alcanza su pico alto a los 10 días pos servicio (Galina & Valencia, 2008).

## 9 Inseminación artificial en cerdas

Según el punto de deposición del semen las técnicas de inseminación se agrupan como:

### 9.1 Inseminación cervical o standard (SAI)

En SAI fijamos el catéter al inicio del cérvix. El semen debe atravesar este laberinto y alcanzar el cuerpo del útero, desde donde se distribuye a ambos cuernos. Las técnicas utilizadas pretenden mejorar el paso del semen por el cérvix y conseguir que llegue suficiente cantidad al cuerpo del útero, para garantizar la fecundación. Por eso se insemina con semen fresco, con el macho delante, estimulando la cerda con masajes, simulando la monta con la ayuda de mochilas u otro tipo de material y se aplican técnicas de autoinseminación (Torrentes et al., 2013)

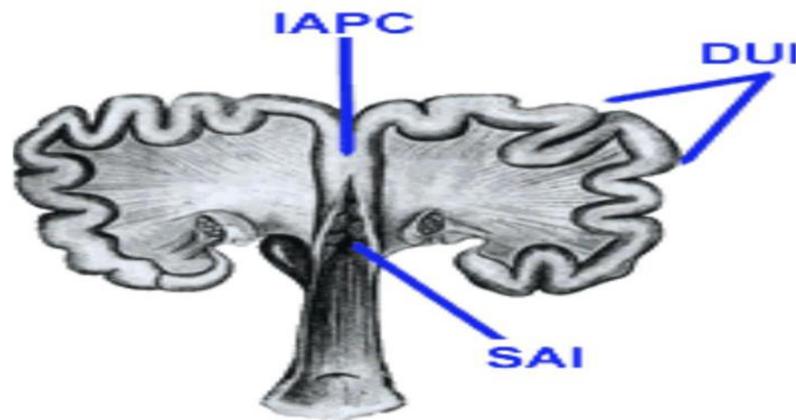
#### 9.1.1.1 Inseminación post cervical (PCAI)

En PCAI se infunde el semen directamente en el cuerpo del útero. Esto permite la fecundación en ambos cuernos. Para ello se utiliza una cánula más larga, fina y flexible que un catéter convencional. Esta cánula está concebida para pasar entre las anfractuosidades del cérvix sin causar daños. Para poder introducir la cánula con facilidad en el cérvix, se utiliza un catéter guía. La cánula post cervical se introduce por el interior

de un catéter que previamente se ha fijado en el cérvix como se haría en una inseminación convencional (Torrentes et al., 2013)

## 9.2 Inseminación intrauterina profunda (DUI)

En DUI, el material utilizado es muy similar al empleado en PCAI, pero la cánula es considerablemente más larga. El objetivo es depositar el semen sólo en uno de los cuernos, lo más cerca posible de la unión útero-túbarica (UUT). Esto dificulta enormemente la fecundación bilateral, por lo que puede reducirse la prolificidad (Torrentes et al., 2013).



*Ilustración 3 Zona de deposición del semen según tipo de inseminación (Gil, 2007)*

## 10 Pasos para la aplicación del semen

Limpiar la vulva con gaza y agua destilada, abrirlos labios vulvares e introducir el catéter previamente lubricado con unas gotas de semen o gel lubricante no espermicida. (Torrentes et al., 2013).



*Ilustración 4 Limpieza de la vulva tomada de (Torrentes & Torres, 2013)*

Desplazar suavemente el catéter hacia adelante y arriba en un ángulo de  $45^\circ$  dirigiéndolo hacia la columna vertebral para evitar introducirlo al meato urinario y dar suaves movimientos de empuje y rotación (Torrentes et al., 2013).



*Ilustración 5 Introducción del catéter en ángulo de  $45^\circ$  tomada de (Torrentes & Torres, 2013)*

Una vez introducido parte del catéter, se notará cierta resistencia, es la entrada al cérvix, rote el catéter en el sentido contrario a las agujas del reloj para que el extremo del mismo quede trabado en los pliegues del cuello uterino, que se encuentran turgentes y facilitan el sellado perfecto del catéter (Torrentes et al., 2013).

Sacar la dosis del termo y rotarla para resuspender las células, romper el orificio de salida del semen y acoplar el frasco al extremo libre del catéter introduciendo lentamente el contenido, permitiendo que el semen fluya por gravedad. En las cerdas multíparas el contenido desciende fácilmente por gravedad, en las primerizas a veces es necesario una ligera presión.(Torrentes et al., 2013).



*Ilustración 6 Deposición del semen, tomada de (Torrentes & Torres, 2013)*

Una vez terminado el proceso dejar el catéter colocado en el cérvix para evitar reflujos del semen, esperar para que la cerda lo libere de manera fisiológica y retire el catéter suavemente rotándolo en sentido a las agujas del reloj. La duración de la inseminación debe ser entre 5 y 10 minutos (Torrentes et al., 2013).



*Ilustración 7 Finalización de la IA  
tomada de (Torrentes & Torres, 2013)*

Si la cerda se encuentra en celo en la mañana se debe inseminar a la mañana siguiente, si la cerda entro en celo en la tarde, es conveniente inseminarla en la tarde del día siguiente. Las otras montas o inseminaciones se hacen cada doce horas con un máximo de 3 servicios a fin de abarcar el máximo periodo de la ovulación (INVITA, Melissa Álvarez 2006).

## **11 Método de detección de celo en cerdas**

Las cerdas entran en celo cada 21 días en promedio si estas no son montadas repetirán cada tres semanas; la duración del celo varia de 36 a 96 horas. De uno a dos días antes, hay síntomas que nos permiten detectarlo; se divide en tres momentos:

### 11.1 Precelo tiempo antes del celo se caracteriza por:

- Vulva agrandada y enrojecida
- Nerviosismo
- Gruñidos
- Poco moco vaginal
- Muerde las jaulas y los comederos
- Monta a otras cerdas
- Busca al verraco
- Prueba de presión sobre el lomo negativa



*Ilustración 8 Cerda en celo, vulva enrojecida y grande tomada de (Melissa, 2006)*

#### 11.2 Celos o tiempo de celo verdadero

- Vulva un poco enrojecida e hinchada
- Moco vaginal, a veces abundante
- Pierde el apetito, a veces hay salivación
- Lomo arqueado
- Ojos vidriosos
- Cola hacia arriba y en movimiento
- Gruñido característico
- Se deja montar por otras cerdas
- Inmovilidad al presionar el lomo



*Ilustración 9 Cerda con reflejo de lordosis momento ideal para la monta o IA, tomada de (Melissa, 2006)*

### 11.3 Post celo o tiempo después del celo

- Ya no existe hinchazón ni enrojecimiento de la vulva
- Reflejo de inmovilidad ya no existe
- Durante este momento se ha pasado la etapa fértil
- La cerda vuelve a su condición normal

Entre los principales signos del celo mencionaremos el reflejo de inmovilidad (la cerda se está quieta en presencia del macho), de hecho, tendríamos que decir que este “ES el signo”. Pero no podemos dejar dimensionar otros signos que en mayor o menor escala se pueden dar en el celo de la cerda, entre estos destacaremos (Miquel Collell, 2007).

- Agrandamiento de la vulva. En toda la fase del celo.
- Presencia moco pegajoso en vulva. Más presente en la fase final del celo.
- Intentos de montar a sus compañeras. Apreciable cuando están en grupos.
- Inapetencia. Durante el celo se produce un aumento de estrógenos (una hormona) en la cerda. Los estrógenos tienen un cierto efecto depresor del hambre sobre la cerda.

- Gruñidos. La cerda emite unos gruñidos de larga duración.

- Orejas erguidas hacia arriba. En presencia de macho algunas cerdas levantan las orejas.
- Cola levantada. Al igual que puede suceder antes del parto (de hecho es un signo más de la inminencia de parto), algunas cerdas en presencia de macho pueden levantar ligeramente la cola.

## **12 Aparato reproductor del cerdo**

Los órganos reproductores del verraco se caracterizan por la posición sub anal del escroto, unas grandes glándulas vesiculares y bulbouretrales y un pene fino dotado de una flexura sigmoidea.

### 12.1 Cola del epidídimo

Es prominente y palpable, y el respectivo polo del testículo apunta en dirección caudodorsal cerca del ano. El borde libre del testículo mira en dirección caudoventral, en tanto que el borde de inserción está aplicado contra la superficie caudal del musculo (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

### 12.2 Cordones espermáticos

Están junto con el pene en el espacio subcutáneo comprendido entre los muslos. Las tunicas vaginales y los cremásteres adheridos a su superficie medial están encerrados por una gruesa fascia espermática que se fusiona con la fascia medial de los muslos.

### 12.3 Conducto deferente

Vira marcadamente en dirección dorso medial para desaparecer entre la vejiga urinaria y la gran glándula vesicular. Sin agrandarse para formar ampollas, los conductos

derecho e izquierdo convergen por dorsal con la uretra, penetran en el cuerpo de la próstata y desemboca en la uretra pelviana sobre una ligera elevación (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

#### 12.4 Glándulas vesiculares

Desembocan en la uretra junto a los conductos deferentes. Estas glándulas son tan grandes que solo sus extremos caudales están en la cavidad pelviana y su mayor parte sobresale dentro de la cavidad abdominal más allá del cuello de la vejiga, donde están rodeadas por el pliegue genital (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

#### 12.5 Próstata

Es pequeña e irregular. La mayor parte de la próstata del verraco esta diseminada dentro de la pared de la uretra pelviana y emite su secreción por medio de numerosas aberturas pequeñas (Dyce, Sack, & Wensing, 1991).

#### 12.6 Glándulas bulbo uretrales

Son notables por su forma y tamaño. Están a dorso lateral de la uretra pelviana, en la cual descargan su secreción mediante conductos únicos que desembocan cerca de la arcada isquiática.

#### 12.7 Glándulas genitales accesorias

Están relacionadas con el volumen de eyaculado, que promedia unos 200 ml

#### 12.8 Pene

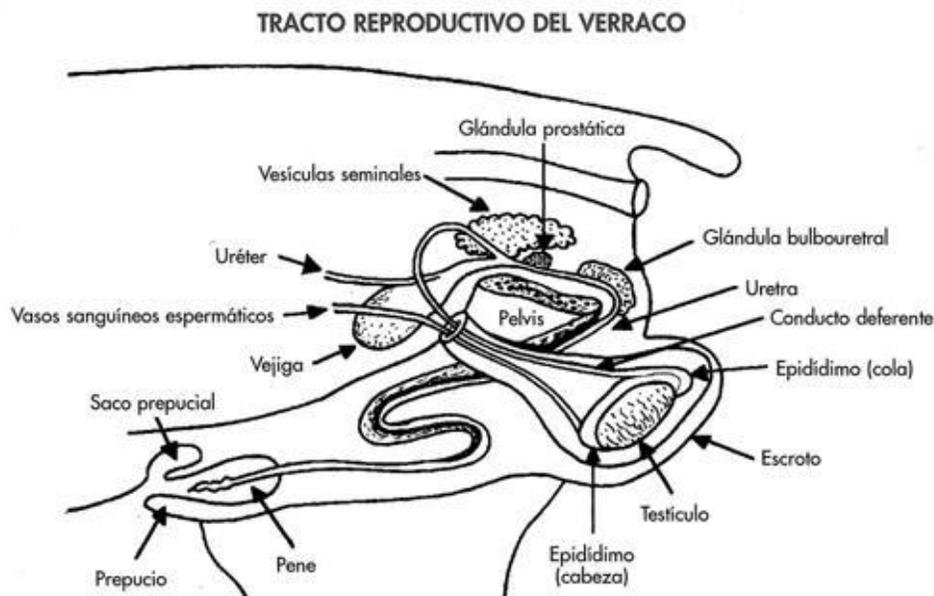
Compuesto por cuerpo esponjoso se agranda para formar un engrosamiento en superficie caudal (Dyce, Sack, & Wensing, 1991). Este engrosamiento está cubierto en su porción caudal por el grueso bulbo esponjoso y forma el bulbo del pene.

### 12.9 Pilares del pene

Se originan en la arcada isquiática a craneal del bulbo y, rodeados por los músculos isquiocavernosos, convergen para formar el cuerpo del pene que mide 60 cm de largo cuando está flácido y tiene una gruesa túnica albugínea que envuelve el cuerpo cavernoso y el cuerpo esponjoso (Dyce, Sack, & Wensing, 1991). El pene está retorcido en su eje longitudinal más o menos en una vuelta anti horaria completa al mirarlo de distal.

### 12.10 Prepucio

Relativamente largo y aloja la parte libre del pene en su estrecha mitad caudal. La mitad craneal es más ancha y se comunica dorsalmente con un divertículo prepucial, saco que contiene un líquido maloliente constituido por detritos celulares empapados de orina (Dyce, Sack, & Wensing, 1998). El divertículo se halla cubierto por el músculo prepucial craneal que lo vacía antes de la cópula y lubrica el pene; aparte que produce el mal olor que rodea el verraco.



*Ilustración 10 Aparato reproductor del verraco tomada de (Muirhead & Alexander, 2005)*

## 13 Fisiología reproductiva del macho

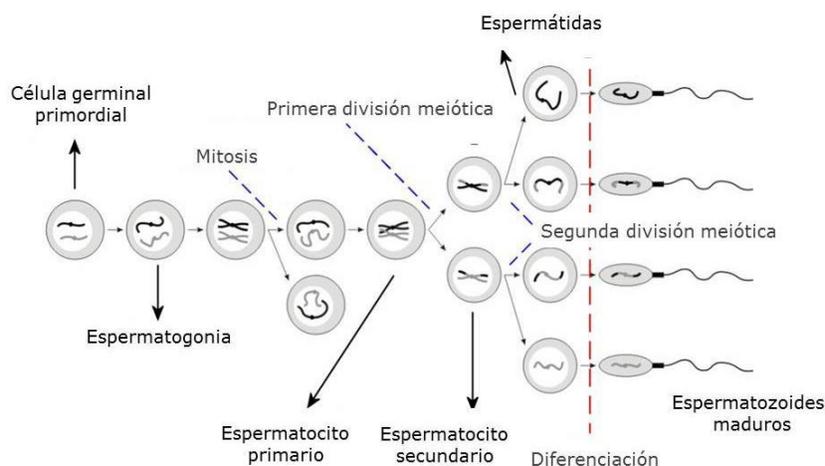
### 13.1 Espermatogenesis

El ciclo del túbulo seminífero es la serie de cambios que ocurren en un área del mismo a partir de una fase de asociación celular, hasta que esa área recupera su imagen inicial.

En el verraco se han detectado ocho fases que se efectúan en el transcurso de 8 a 6 días.

La espermatogenesis, o transformación de espermatogonia en espermatozoide maduro, se efectúa en 34.4 días. El espermatozoide tarda 10.2 días en recorrer el epidídimo, periodo durante el cual sufre cambios en su madurez que le confieren su capacidad fecundante. Así, los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del

epidídimo tienen una baja tasa de fertilización, mientras que los que se hallan en la porción proximal y distal del mismo presentan una alta tasa de fertilización (Ramírez, 2006).



*Ilustración 12 Espermatogenesis tomada de (Valdés, 2015)*

## 14 Métodos de recolección de semen

### 14.1 Manual

El material utilizado en este método consta de un guante estéril muy fino que no afecte la sensibilidad de la mano. Y un termo bien esterilizado, con capacidad para 400 o 500 cm<sup>3</sup> y 37°C de temperatura, a fin de evitar choques térmicos (Ramírez, 2006).

Para evitar la contaminación del material utilizable en inseminación debe filtrarse, con una grasa para separar la de la masa gelatinosa procedente de la glándula de Cowper, bulbo uretral.

#### 14.2 Vagina artificial

El operario la lleva en su mano derecha y dirige el pene hacia adentro con la mano izquierda. Al sentir el canal lubricado y los 37°C de temperatura, el verraco mueve el pene instantáneamente en forma cilíndrica, presiona la vagina mediante una pera de Richardson con lo que se produce la estimulación, el verraco erecciona el pene que queda aprisionado iniciando la eyaculación(Ramírez, 2006).

#### 14.3 Transporte del semen

Uno de los principales inconvenientes en el transporte del semen es la conservación de una temperatura estable, entre 14 a 17 °C.

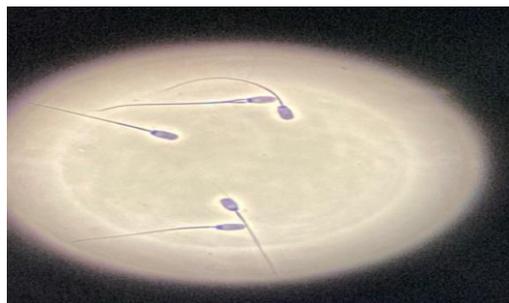
### **15 Generalidades del espermatozoide porcino**

El espermatozoide porcino es extremadamente sensible a la peroxidación lipídica, debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana y a la baja capacidad antioxidante del plasma seminal, generando una excesiva formación de radicales libres, perjudicando aún más la integridad y funcionalidad de las membranas (Suhevic, 2015). El colesterol también mantiene la integridad de la membrana plasmática por la alta sensibilidad del espermatozoide del cerdo al choque térmico, lo cual está relacionado con la cantidad relativamente baja de moléculas de colesterol que, durante el enfriamiento, conduce a la separación de fase lateral de los lípidos y la agregación irreversible de proteínas con la pérdida de la permeabilidad selectiva. La acción protectora y la capacidad de estas proteínas de prevenir la capacitación de los espermatozoides; se conocen como factores de descapitación y pueden influir en la criotolerancia de los espermatozoides; se ha establecido que las cantidades relativas de

proteínas presentes en el plasma seminal PS (Fibronectina 1, FN1); interfieren en la buena y mala capacidad de congelación de los eyaculados ya que los componentes del plasma seminal PS, son considerados instrumentos de gran potencial para mejorar la aplicación de nuevas tecnologías al momento de la crío tolerancia espermática (Valencia et al., 2020). Las proteínas que están presentes en el PS del verraco en un 90% son las espermadhesinas las cuales se unen a la membrana espermática durante la eyaculación y son liberadas durante la capacitación de los espermatozoides.

Estos poseen característica de tolerancia osmótica son de gran importancia al momento de aplicar biotecnologías como la crío preservación, dados los cambios osmóticos drásticos que allí ocurren por la crío injuria que afecta la membrana espermática durante el enfriamiento y la restricción de los movimientos laterales de los fosfolípidos; en la medida en que va disminuyendo la temperatura, el agua extracelular se va congelando, y la concentración del medio de congelación aumenta como consecuencia, convirtiéndose en un ambiente más hipertónico (Yeung et al. 2006, Petrunkina et al. 2007a, Petrunkina et al., 2004). Como respuesta, la célula espermática sufre más deshidratación por salida de agua a favor de gradiente de concentración, lo que permite la salida de agua intracelular. En este caso, si la velocidad de congelación es lenta, el desequilibrio osmótico generado por la aplicación del crioprotector permeable es suplido por la salida de agua, la reducción del volumen celular, y la entrada de crío protector aumentando la osmolaridad intracelular con el fin de evitar la formación de cristales de hielo intracelulares que puedan dañar la membrana del espermatozoide; se ha despertado un interés en investigar todo lo relacionado con el mecanismo subyacente en la interacción de los componentes del plasma seminal (PS), y las proteínas protectoras que

recubren la membrana plasmática de los espermatozoides que generan una estabilidad de la misma; acompañada de una prevención del eflujo de colesterol (Valencia et al., 2020).



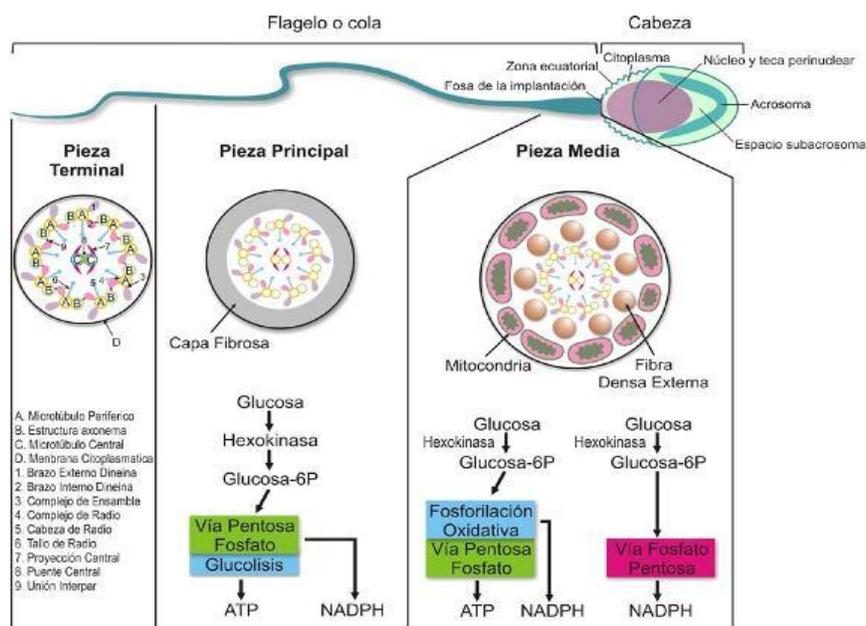
*Ilustración 13 Espermatozoides porcinos  
fuente propia. Laboratorio de reproducción animal  
(Universidad de Caldas, 2022)*

## **16 Proceso de capacitación espermática**

La capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide son eventos que se desarrollan en el aparato reproductor de la hembra y son indispensables para vertebrados de fecundación interna (Arenas et al., 2010). Estos eventos requieren inicialmente la eliminación de los factores descapitantes presentes en el semen, así como una serie de cambios en el espermatozoide tanto lipídicos como proteicos de su membrana celular, la activación de canales iónicos, la síntesis de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), la fosforilación-desfosforilación proteica, la activación de enzimas, la reacción acrosomal con exocitosis y fusión de membranas, la vesiculación y finalmente un aumento considerable de su movilidad.

La capacitación es un proceso del espermatozoide que comprende una serie de cambios previos a la fecundación, se desarrolla en el aparato reproductor femenino en vertebrados de fecundación interna, y requiere de la comunicación entre el

espermatozoide y los ambientes que recorre en su tránsito hacia el sitio de fertilización. Cuando se une al ovocito, se induce otro proceso denominado reacción acrosomal (exocitosis), así como la hiper movilidad, que es un movimiento especial del flagelo, el cual facilita su desplazamiento, la penetración de las cubiertas del ovocito y finalmente la unión con este (Arenas et al., 2010). Hay que aclarar que el proceso de capacitación puede también ser inducido *in vitro*.



*Ilustración 14 Procesos fisiológicos del espermatozoide tomada de [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902006000400008](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008)*

## 16.1 Cabeza

Es el núcleo, con ADN súper enrollado, gracias a las proteínas denominadas *protaminas* que sustituyen a las histonas en otros tipos celulares, con una envoltura nuclear (EN) de la cual se han removido durante la espermatogenesis los complejos de

poro nuclear (CPN), con excepción de algunas especies que las presentan. El citoesqueleto participa en el soporte de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal y algunos de sus elementos son termosensibles. El principal elemento del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide es la teca peri nuclear (TP), que es una cápsula rígida que cubre el núcleo del espermatozoide de mamíferos y tiene como función la unión de las membranas espermáticas y la preservación de su integridad (Arenas et al., 2010).

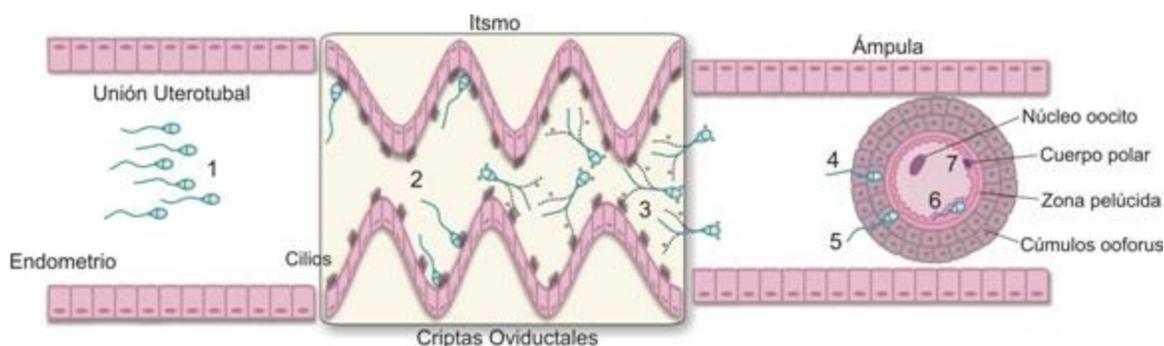
## 16.2 Flagelo

Es la parte encargada del movimiento, se divide en cuatro regiones; la pieza de conexión, que une a la cabeza con el flagelo, la pieza media, que es también llamada cuello y donde se encuentran las mitocondrias en un arreglo helicoidal, la pieza principal que abarca la mayor parte del flagelo utilizado en la propulsión, y la vaina fibrosa o parte terminal de la cola (Arenas et al., 2010). Cada región tiene funciones específicas en el movimiento, reconocimiento del ovocito y la fecundación

## 16.3 Cambios durante la capacitación

La localización de la actina en la región acrosomal de algunas especies de mamíferos respalda su posible participación en la capacitación espermática y en la reacción acrosomal (RA); así, la polimerización y despolimerización de la actina pueden estar involucradas en la función espermática. En el espermatozoide del cerdo, cobayo,

toro, ratón y carnero, la polimerización de la actina ocurre durante la capacitación y el desdoblamiento de la F-actina debe ocurrir para que se lleve a cabo la RA (Arenas et al., 2010). En el espermatozoide de verraco, la inhibición de la polimerización de la actina bloquea su capacidad para fertilizar in vitro.



*Ilustración 15 Procesos fisiológicos previos a la fertilización tomada de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008)*

#### 16.4 Pérdida de los factores descapacitantes

Los factores descapacitantes son moléculas que se originan en las secreciones testiculares, epididimarias y seminales y que funcionan protegiendo a los espermatozoides durante su periodo de almacenamiento en la región caudal del epidídimo, estabilizando el acrosoma o inhibiendo la unión con la zona pelúcida (ZP) del ovocito, por lo que es importante su remoción antes de la fecundación, pues se ha sugerido que estos factores actúan bloqueando a los receptores o grupos electrostáticos localizados en la membrana (Arenas et al., 2010). Cabe señalar que la cara externa de la membrana plasmática es rica en carbohidratos cargados eléctricamente (glicocaliz), en esta cara se

encuentran los carbohidratos absorbidos o polisacáridos unidos a la membrana por uniones superficiales no covalentes.

## **17 Prueba de evaluación de la integridad de la membrana del espermatozoide**

La supervivencia espermática en semen porcino se evalúa mediante la coloración con Yoduro de propidio (PI de la nominación en inglés: propidium iodide). El PI es un colorante que tiene la propiedad de atravesar solo la membrana plasmática permeable (dañada) o en proceso de degeneración, para unirse y teñir el ADN celular, sirviendo de indicador del daño de la membrana (Silva y Gadella, 2006); cuando el PI penetra la célula, emite una fluorescencia roja en la cabeza del espermatozoide, por tanto, permite identificar la población de espermatozoides viables que no presentan coloración (Silva y Gadella, 2006).

### **17.1 Prueba de función y resistencia espermática**

Con este método se pueden distinguir y cuantificar fácilmente los espermatozoides funcionalmente competentes, es decir: vivos, con funcionalidad bioquímica de la membrana, con resistencia acrosómica, sin anomalía de cabeza y tracto intermedio, sin gotas citoplásmicas y no aglutinados. El test de hinchazón hipoosmótica (HOST, de su nombre en inglés, Hypoosmotic Swelling Test) es una prueba que determina la funcionalidad de la membrana plasmática, mediante exposición de los espermatozoides en

un medio hipoosmótico (propiedad de presión de una solución que está relacionada con la baja concentración de su soluto), debido a que la exposición de estos a condiciones hipoosmóticas produce aumento de la entrada de agua en un intento de alcanzar el equilibrio osmótico, lo cual aumenta el volumen de la célula (Jeyendran et al., 1984). La presencia de colas hinchadas es signo de que el paso a través de la membrana se da normalmente (Pérez-Llano et al., 2001). La combinación del HOST y la tinción con PI, permite evidenciar la proporción de células vivas, y con funcionalidad de membrana después de estrés osmótico (Pérez-llano et al., 2009); y la fijación con glutaraldehído al 2% o solución salina formulada después de HOST permite evidenciar los espermatozoides con resistencia acrosómica (Pérez-llano et al., 2003; Pursel y Johnson, 1974). En el caso de la aglutinina de cacahuete de *Arachis hypogaea* ligada a fluoresceína 5-isotiocianato FITC-PNA, es una aglutinina que se une a azúcares específicos de la membrana acrosomal externa los cuales se exponen luego de que el espermatozoide ha tenido un daño en el acrosoma o una reacción acrosómica (Silva y Gadella, 2006). En este sentido, es importante mencionar que un espermatozoide que ha tenido reacción acrosómica de manera prematura, antes de la inseminación, es un espermatozoide no viable. Ambos el PI y el FITC-PNA se detectan mediante microscopía de fluorescencia con un filtro de 488nm. De otro lado, la evaluación, al mismo tiempo y en los mismos espermatozoides con tinción con técnica de contraste de fases permite ver alteraciones morfológicas en los espermatozoides, de tal manera que la combinación de estas técnicas para evaluar varias características del espermatozoide a la vez, permite la identificación de una población élite con alto potencial de fecundar.

## 18 Diluyente

Un diluyente se considera aquella solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de fertilidad adecuado (Valencia2006).

La dilución del semen porcino es una práctica que brinda a la industria porcina la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco, para ello los diluyentes en donde se conserva el material seminal, deben proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y los antibióticos para la inhibición del desarrollo microbiano (Cuenca Condoy & Avellaneda Cevallos, 2017).

### 18.1 Tipos de diluyente

#### 18.2 Diluyentes de corto plazo

Se utilizan principalmente en lugares donde la distribución de las dosis seminales es a corta distancia, conservan el semen a 15-20°C (15), entre las principales ventajas que presentan estos diluyentes consta:

- La utilización de una concentración espermática baja, que permite realizar más inseminaciones con una sola recolección.
- El bajo costo en su preparación, obteniéndose resultados reproductivos similares.

El BTS, conocido también como fórmula base o diluyente de referencia, permite mantener viable el material espermático a 17°C durante unos 5 días.

El citrato de sodio-yema de huevo, considerado como diluyentes de primera generación, fue empleado para la conservación de semen porcino

Por un periodo de 24 horas.

### 18.3 Diluyentes de largo plazo

Tienen una duración de 4 días o más, se utilizan en zonas donde el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado el semen es distante, (Cuenca Condoy & Avellaneda Cevallos, 2017); además son muy complejos, permitiendo conservaciones de 5 a 6 días requiriendo ciertas exigencias en cuanto a la fracción que se va a recoger, tipo de dilución con agua destilada, control elevado de contaminación bacteriana utilizando un antimicrobiano no espermicida, y con una refrigeración entre 15-17°C.

Androstar Plus®, MRA® y MIII®, analizando: viabilidad, funcionalidad de membrana, integridad acrosomal y movilidad, ellos determinaron que no existen diferencias significativas, entre estos diluyentes siendo similar su capacidad de conservación durante un periodo de 4 días.

Entre las principales ventajas que nos ofrecen estos diluyentes constan la posibilidad de transportar el semen a largas distancias, ahorro de

importaciones y reducción de costos por concepto de sementales, alimento e instalaciones, (Cuenca Condoy & Avellaneda Cevallos, 2017); además permiten realizar pruebas diagnósticas del semen antes de ser utilizadas, para comprobar la presencia de virus, calidad del semen, y por ultimo brindan una mejor distribución de las muestras seminales.

## **19 Predicción de la fertilidad en el ganado porcino**

Para predecir que un eyaculado de un verraco es fértil, se evalúan parámetros bioquímicos como la tinción vital. La cual evalúa morfoanomalías totales, el acrosoma y las variaciones de la funcionalidad de membrana. Los test de funcionalidad, pueden ser una herramienta útil, para desechar los eyaculados de baja calidad aunque esta técnica no alcanza la sensibilidad predecible para dar un resultado positivo en la predicción de fertilidad del macho(Gadea, 1997).

A continuación se mencionaran aspectos complementarios que permitan predecir la fertilidad en el ganado porcino, ya que su evaluación se realiza directa mente en campo.

19.1.1.1.1 Índices productivos y reproductivos evaluables en la producción porcina tomado de (Martínez &Ramírez, 2010).

- Porcentaje de fertilidad, es el número de cerdas que quedan gestantes, expresado en porcentaje. Para ello se tiene que en cerdas primerizas se tiene un 85 a 95%. En el caso de las cerdas multíparas 80 a 85%.

- Tasa de no retorno a celo, es el número de cerdas servidas que manifiestan signos de estro, lo cual se evalúa desde el día 18 postservicio hasta el día 23; este se debe realizar dos veces al día, detectando visualmente, este el método más utilizado por sus bajos costos.

- Porcentaje de repeticiones, es el número de cerdas que no quedan gestantes después de recibir su servicio, expresado en porcentaje. Para ello se tiene que en cerdas primerizas, se tiene un 20% o menos, en cerdas multíparas se tiene un 15% o menos, y en general va de un 15% a 20%.

- Promedio de lechones paridos vivos, es el promedio de lechones paridos vivos por cerda en cada parto. Para ello se tiene que en cerdas primerizas se tiene un rango de 8 a 10 lechones y en cerdas múltíparas un rango de 9 a 12 lechones.
- Promedio de lechones paridos muertos por parto, son los lechones que mueren en el último tercio de la gestación o durante el parto. Expresado en porcentaje va de un 4% a un 9%.
- Promedio de momias, son los fetos que murieron durante el segundo o tercer tercio de la gesta
- Promedio de lechones paridos en total, es la suma de los lechones paridos vivos + muertos + momias. Va de un rango de 8 a 12 lechones totales. Este parámetro se afecta por el sistema de cruce- miento que se tiene o las montas que se tengan, dependiendo de éste la fertilización lograda.
- Peso individual de lechón promedio al nacimiento, es el peso individual de los lechones paridos vivos. Va de un rango de 0.800 g a 2.000 g.
- Días de lactancia, la duración va a depender del manejo establecido. Actualmente va de un rango de 21 a 28 días o más.

Posteriormente se evaluarán los parámetros relacionados espermatozoides funcionalmente competentes y su funcionalidad de membrana, se procederá a realizar la prueba combinada hipoosmótica o de HOST, en combinación con Fluoresceína 5-isotiocianato o marcaje PI/FITC-PNA y fijación con solución formolada.

Con este método se pueden distinguir y cuantificar fácilmente los EFC, es decir: vivos, con funcionalidad bioquímica de la membrana, con resistencia acrosómica, sin

anormalidad de cabeza y tracto intermedio, sin gotas citoplásmicas y no aglutinados. La exposición de los espermatozoides a condiciones hipo osmóticas en el HOST produce aumento de la entrada de agua en un intento de alcanzar el equilibrio osmótico, lo cual aumenta el volumen de la célula. La presencia de colas hinchadas es signo de que el paso a través de la membrana se da normalmente.

## 19.2 Antecedentes de la investigación

La tinción de fluorescencia puede categorizar espermatozoides vivos y muertos en el eyaculado e identificar los espermatozoides con mitocondrias activas (Yeste, 2015). mediante esta técnica de tinción fluorescente se obtuvo una intensidad de coloración que permitió una lectura correcta, no existiendo interferencia de tinción entre los fluorocromos (Suhevic, 2015). Además, el procedimiento resultó práctico en condiciones de laboratorio. Al evaluar dos parámetros espermáticos en forma simultánea, se logró una mayor eficiencia para la obtención de los resultados (Miguel et al., 2014). De esta forma investigaciones previas lograron clasificar a las células espermáticas en cuatro subpoblaciones de acuerdo a los patrones fluorescentes obtenidos (membrana plasmática y acrosomal intacta, membrana plasmática y acrosomal dañadas, membrana plasmática intacta y acrosomal dañada y membrana plasmática dañada y acrosomal intacta (Suhevic, 2015).

## 20 Materiales y métodos

### 20.1 Tipo de estudio

Correlacional de predicción, relación entre variables in vitro y una variable dependiente in vivo

### 20.2 Línea de investigación

Biología de la reproducción animal

### 20.3 Lugar de investigación

Tres granjas ubicadas en los departamentos de Cundinamarca, Caldas y Cauca

Granja Agropecuaria Alfa S.AS. Vereda la Tetilla, Cundinamarca

Granja Topigsgenética, Municipio de Belalcázar Caldas

Granja Los Naranjos, Municipio del Tambo Cauca

#### 20.3.1.1.1 Universo poblacional y tamaño de la muestra

Catorce (14) eyaculados obtenidos de 14 verracos provenientes de tres granjas porcícolas, entre 400 y 800 días de edad, línea genética TRAXX, PIC 410 y PIC 337, alimentados con concentrado comercial para verracos 2-3 Kg/día, agua *ad libitum*, en jaulas de 2,4 × 0,6 mts, con frecuencia de eyaculación de mínimo 4 días y máximo 8 días en horas de la mañana (7:00 -9:00 a.m.), manejo de acuerdo a los estándares de centros de inseminación para porcinos.

## 20.4 Obtención de las muestras

Los eyaculados fueron obtenidos mediante la técnica de mano enguantada y filtración de la fracción gelatinosa (tapioca) entre 7am a 8am, la colección se realizó en un termo apto para semen porcino; seguidamente, se realizó medición de la concentración espermática mediante espectrofotometría para realizar dilución  $30 \times 10^6$  ml en dosis de 100 ml en diluyente Androstar Plus®. Posteriormente se realizó enfriamiento lento y progresivo hasta 17C° durante 2 horas.

## 20.5 Diseño experimental

Para establecer la relación entre la resistencia al estrés osmótico y la funcionalidad espermática con la tasa de no retorno a los 18 días – 22 días pos inseminación, se evaluaron 12 eyaculados *in vitro* en contra muestras de semen diluido, paralelamente, con el resto de dosis producida por eyaculado se realizó inseminación artificial a las cerdas. La resistencia al estrés osmótico y la funcionalidad espermática se evaluaron mediante dos test de laboratorio: el HOST (test de hinchazón hipoosmótica) (Pérez-Llano et al., 2001) y la prueba de EFC (Espermatozoides funcionalmente competentes) (Valencia et al., 2019), con modificaciones menores (Ver Tabla 1). A las cerdas se les hizo detección de celo entre los 18 y 22 días pos inseminación para establecer la tasa de no retorno.

**1 Tabla Variables evaluadas, definición, técnica utilizada, unidades de medición y valores de referencia función y resistencia de membranas del espermatozoides porcinos y su correlación con la tasa de no retorno a celo**

Variables		Descripción de la variable	Técnica utilizada	Unidades de medición	Valores de referencia
Independientes	Funcionalidad de la membrana espermática	Espermatozoides cuya membrana es funcional y permite la entrada del agua a la célula por ósmosis en un ambiente hipoosmótico	Test de hinchazón hipoosmótica (HOST, hypoosmotic swelling test)	Porcentaje	$\geq 60$ % Pérez-Llano et al. (2001)

	Espermatozoides funcionalmente competentes	Población de espermatozoides con integridad y funcionalidad de la membrana, con morfología normal, con el acrosoma íntegro después de sufrir estrés hipoosmótico (Resistencia osmótica), que potencialmente fecunda	Prueba combinada viabilidad por PI, integridad del acrosoma con FITC-PNA, resistencia de membrana por estrés hipoosmótico	Porcentaje	≥25 % Valencia et al. (2009)
Dependiente	Tasa de no retorno	No detección de celo después de 18 a 22 días pos inseminación de la cerda	Detección cada 12 horas entre los días 18 a 22 después de la inseminación con macho recelador	Porcentaje	≥95%

## 20.6 Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS para Windows (Ver. 25.0; Chicago, IL, USA). Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad a través de los tests de Shapiro-Wilk y de Levene.

Se realizó análisis de correlación de Pearson al cumplir con los criterios de normalidad y homogeneidad de varianza y se consideraron correlaciones significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad  $P < 0,05$ . Las correlaciones realizadas fueron entre la proporción de espermatozoides funcionalmente competente y el porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de membrana, y luego correlación entre las dos variables anteriores con la tasa de no retorno. En caso de correlaciones moderadas a altas y significativas se realizó un análisis de regresión lineal para establecer el valor predictivo de las variables. El resultado del análisis es un coeficiente de correlación que puede tomar valores entre -1 y +1, siendo correlación baja y positiva entre 0 y 0,39, correlación moderada entre 0,4 y 0,69, correlación alta entre 0,7 y 0,89 y muy alta entre 0,9 y 0,99. El  $R^2$  es el porcentaje de variación de la variable de respuesta que explica su relación con

una o más variables predictoras, este valor entre más alto la variable independiente explica o predice mejor la variable dependiente.

## **21 Preparación y conservación de las muestras**

El material a analizar es una contra muestra de semen diluido refrigerado, preparada en cada granja y transportada al laboratorio de acuerdo con sus propios protocolos. Los criterios básicos aplicados son: dosis seminales de 80 a 100 mL con  $2,5-3 \times 10^9$  células, empacadas en recipientes plásticos estériles bien cerrados y completamente identificados, refrigeradas a 15-17,7 °C en diluyente Androstar Plus®, y enviadas al laboratorio inmediatamente después de procesadas.

### 21.1 Desarrollo de las pruebas de resistencia y funcionalidad espermática

### 21.2 Prueba de espermatozoides funcionalmente competentes (EFC)

El método a continuación se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Pérez- llano et al. (2009) y Valencia et al. (2019), con modificaciones.

### 21.3 La prueba consistió en una combinación del sHOST, marcaje con PI/FITC-PNA y fijación con solución formolada

La combinación del sHOST y el marcaje con PI y FITC-PNA permite evidenciar la proporción de células vivas, con funcionalidad de membrana y resistencia acrosómica después de estrés osmótico; y la fijación con solución formolada permite evidenciar los espermatozoides con formas anormales. PI y FITC-PNA se detectan mediante microscopía de fluorescencia con un filtro de 488nm.

#### 21.4 Reactivos

- Solución stock de PI: 5 mL de una solución 2,4 mM en agua.
- Solución BTS (Beltsville Thawing Solution (w/v): se disuelven 37 g de glucosa, 6 g de citrato de sodio, 1,25 g de bicarbonato de sodio, 1,25 g de EDTA, 0,75 g de cloruro de potasio y kanamicina al 7% (70 mg de kanamicina en agua Tipo I c.s.p. 1000 mL).
  - Solución hipoosmótica a 75 mOsm/Kg (p/v): 0,245 g de citrato de sodio, 0,450 g de fructosa y agua tipo I c.s.p. 100 mL.
  - Solución de trabajo de FITC-PNA: lograr concentración de 20 ug/ml de FITC-PNA (con el reactivo viejo del laboratorio de U Caldas FITC-PNA se agrega 4  $\mu$ L de este por cada 20  $\mu$ L de PBS).
  - Segunda forma de preparación FITC-PNA: con el reactivo nuevo L7380 de sigma se agrega 1000  $\mu$ L de agua tipo I al frasco y se mezcla. Esta será una solución stock. Luego se realiza una dilución 1:1 en PBS de la solución stock (100  $\mu$ L de solución stock y 100  $\mu$ L de PBS) para crear una solución de trabajo, volumen total 200  $\mu$ L.

#### 21.5 Materiales y equipos

- Balanza semianalítica
- Micropipeta de 100-1000  $\mu$ L (puntas desechables)
- Micropipeta de 1-10  $\mu$ L (puntas desechables)
- Microscopio epifluorescencia con Filtro de 488 nm, con objetivo de 100 x y con contraste de interferencia.
- Contador manual con capacidad mínima de conteo 100

- Viales desechables de plástico de 1,5 mL, con tapa.
- Portaobjetos de vidrio de 75x25 mm y laminilla de 22x22 mm
- Frasco de tapa rosca estéril de 50 mL
- Guantes de nitrilo
- Baño de maría 36-38 °C
- Nevera de almacenamiento a -20°C
- Nevera para almacenamiento de semen porcino a 16°C
- Votrex

#### 21.6 Preparación y conservación de las muestras

El material a analizar es una contra muestra de semen diluido refrigerado, preparada en cada granja y transportada al laboratorio de acuerdo con sus propios protocolos. Los criterios básicos aplicados son: dosis seminales de 80 a 100 mL con 2,5-3 x10<sup>9</sup> células, empacadas en recipientes plásticos estériles bien cerrados y completamente identificados, refrigeradas a 15-17,7 °C en diluyente Androstar Plus®, y enviadas al laboratorio inmediatamente después de procesadas.

#### 21.7 Procedimiento

##### 21.7.1.1.1.1 Preparación de la suspensión, incubación y fijación.

- Se homogenizó manualmente la muestra de semen invirtiendo suavemente el frasco y depositar 1,5 mL en un vial

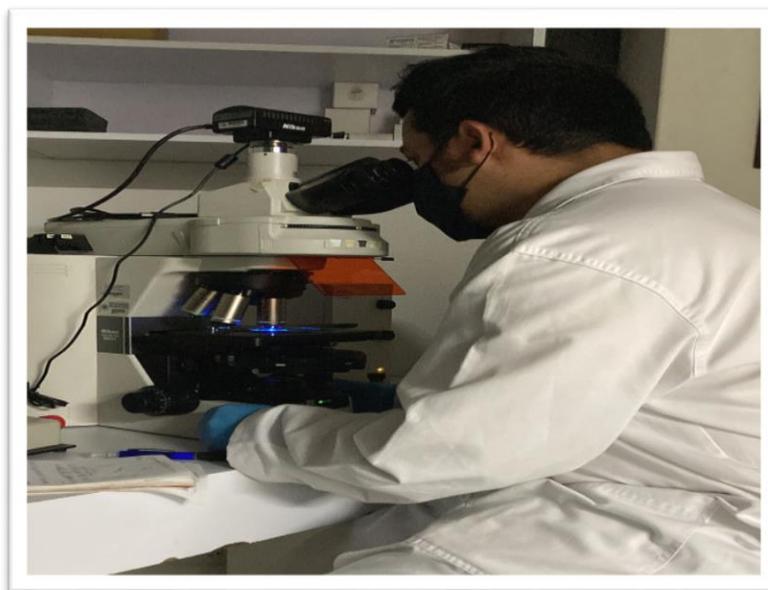
- Se depósito 1 mL de solución hiposmótica, 10  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo FITC-PNA y 5  $\mu\text{L}$  de la solución stock de PI 2,4 mM en un segundo vial
- Se dispuso del vial con semen y el vial con la mezcla anterior, por separado, en un baño maría a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se encendió el baño maría para subir progresivamente hasta  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  en 15 minutos.
- Después de que subió hasta  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , transfirió 500  $\mu\text{L}$  de semen, previamente homogenizado con dos pipeteos suaves, al segundo vial con la mezcla de reactivos, se homogenizó con dos pipeteos suaves y se dejó por 5 minutos a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de solución salina formolada a la mezcla del semen con los reactivos para fijar los espermatozoides.
- Se homogenizó la mezcla anterior en vortex por 5 segundos, se dispuso 5  $\mu\text{L}$  en un portaobjetos de vidrio y colocar cubreobjetos



*Ilustración 16 Montaje de los marcadores PI y FITC-PNA, fuente propia, laboratorio de reproducción animal Universidad de Caldas, 2022*

### 21.8 Observación en el microscopio

Se examinó la preparación en un microscopio de epifluorescencia a 1000 X de magnificación, con un filtro de 488 nm y contraste de interferencia. Se realizaron 3 conteos de 100 espermatozoides cada uno.



*Ilustración 17 Evaluación de espermatozoides porcinos, fuente propia, laboratorio de reproducción animal. Universidad de Caldas, 2022*

### 21.9 Prueba de funcionalidad de la membrana espermática

#### Reactivos

- Agua desionizada y estéril Tipo I.
- Sodio Citrato tribásico bihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 99% de pureza.
- D (-) Fructosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ).
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ).

- Formaldehído, solución al 37% (HCHO), ACS.
- Solución de Cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% en agua Tipo I (w/v): 900 mg de Cloruro de sodio (NaCl) y agua Tipo I c.s.p. 100 mL. Utilizar inmediatamente después de la preparación.
- Solución salina formolada al 0,3% (v/v): 0,3 mL de formaldehído, solución al 37% (HCHO) y 99,7 mL de solución de Cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%. Almacenar en recipiente de vidrio bien cerrado, a 4 °C por un periodo no mayor a un mes para prevenir contaminación.
- Solución hipoosmótica a 75 mOsm/Kg (p/v): 0,4745 g de citrato de sodio, 0,872 g de fructosa y agua tipo I c.s.p. 100 mL

#### Procedimiento

Se homogenizó manualmente la muestra de semen invirtiendo suavemente el frasco y depositar 1,5 mL en un vial, depositar 1 mL de solución hipoosmótica en un segundo vial y 0,5 mL de solución salina formolada en un tercer vial.

- Se dispusieron los viales con semen y con la solución hipoosmótica, por separado, en un baño maría a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se subió progresivamente hasta  $37\text{ °C} \pm 0,3\text{ °C}$  en 10 a 15 minutos.
- Después de subir hasta  $37\text{ °C} \pm 0,3\text{ °C}$ , se transfirieron 350  $\mu\text{L}$  de semen al vial con la solución hipoosmótica, para dejar por 5 minutos a esta misma temperatura y seguidamente depositar 350  $\mu\text{L}$  de esta mezcla al vial con la solución salina formolada.

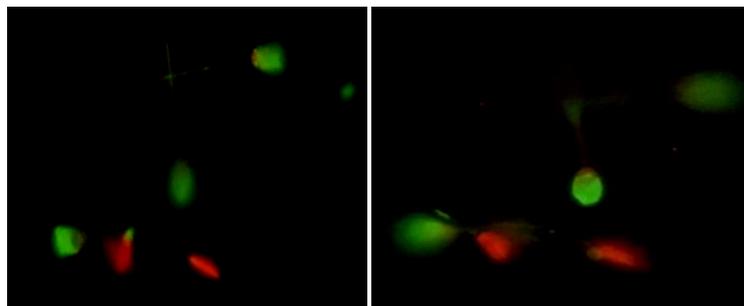
Luego se transfirieron 5 $\mu$ L a un portaobjetos, colocar laminilla y dejar en reposo por 2 minutos.

Se realizó observación en microscopio de contraste de fases a 1000  $\times$  diferenciando los espermatozoides con cola hinchada (enrollamiento de la cola, HOST positivos) y los espermatozoides con sola recta.

## 22 Resultados

Las pruebas de integridad de las membranas de los espermatozoides tanto plasmática como acrosomales hasta el momento no han mostrado correlaciones importantes con la fertilidad en campo; sin embargo, el análisis de morfología y de funcionalidad de membrana han tenido mayor acercamiento. El inconveniente es que cada variable se analiza por separado en pruebas independientes sin discriminar poblaciones de espermatozoides con todas las características normales. Por este motivo, es de suma relevancia implementar una prueba de laboratorio combinada que permita predecir la capacidad fecundante del eyaculado. La calidad seminal disminuye a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, sufriendo alteraciones como, disminución de la movilidad espermática, alteraciones en la integridad de la membrana acrosomal y plasmática como así también su funcionalidad. Mediante el marcador con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), es una lectina que se une a los glucoconjugados de la matriz acrosomal (Suhevic, 2015). Tiene afinidad por la terminación  $\alpha$ -D-glucosil y  $\alpha$ -D-manosil residuales de glicoproteínas, y se une específicamente al azúcar  $\alpha$ -manósido de la matriz acrosomal. Esto se visualiza como una fluorescencia verde-amarillenta ( $\lambda$  emisión=525 nm) sobre la porción anterior de la cabeza y en el segmento ecuatorial; por otra parte el Ioduro de

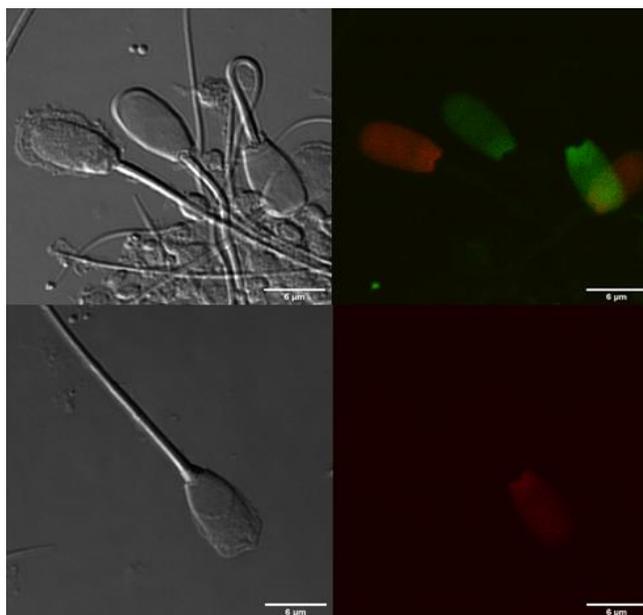
Propidio (PI) es un fluorocromo que solamente ingresa a las células espermáticas cuando éstas presentan su membrana plasmática dañada emitiendo fluorescencia color rojo ( $\lambda$  emisión=570 nm)(Suhevic, 2015).



*Ilustración 18 Fotografía 1 y 2 espermatozoides porcinos con tinción de marcaje con PI y FITC-PNA, fuente propia. Laboratorio de biología de la reproducción animal. Universidad de Caldas 2022*

En la fotografía 1 espermatozoides porcinos muertos que toman una coloración roja, por marcaje con PI

En la fotografía 2 se observan acrosomas dañados que presentaron reacción, al marcador FITC-PNA toma una fosforescencia de color verde.



*Ilustración 19 Espermatozoides porcinos macro y con tinción y marcaje con PI y FITC-PNA, fuente propia laboratorio de reproducción animal. Universidad de Caldas 2022*

Las fotografías comparan la microscopia de contraste de interferencia con la de fluorescencia de la misma muestra de espermatozoides que para las fotos comparativa superior presenta una fosforescencia de color verde con daño de acrosoma que corresponde al marcaje con FITC-PNA, y presenta dos espermatozoides de coloración roja que corresponde al marcaje con PI, lo que corresponde a no ser viables.

**Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides funcionalmente competentes y funcionalidad de membrana *in vitro* con resultados de la tasa de no retorno a celo en distintos departamentos**

Funcionalidad espermática						
Granja	ID eyaculado	Espermatozoides funcionalmente competentes %	Conteo 1 %	Conteo 2%	Funcionalidad de membrana espermática %	Tasa de no retorno%
Granja Cundinamarca	69	44,5	55	34	60	100
	70	33	27	39	55	100
	71	23,5	20	27	50	96,6
	72	41	42	40	75	100
	74	33,5	36	31	70	100
	77	23	22	24	60	96,6
	7801	42	42	42	58	100
Granja Caldas	78	21,5	23	20	55	97,3
	79	15	11	19	45	85
	80	22	30	14	56	100
	81	25,5	24	27	57	97,14
	82	16,5	16	17	40	83,33
Granja Cauca	Verde	23,5	16	31	50	100
	Rojo	24	27	21	65	100

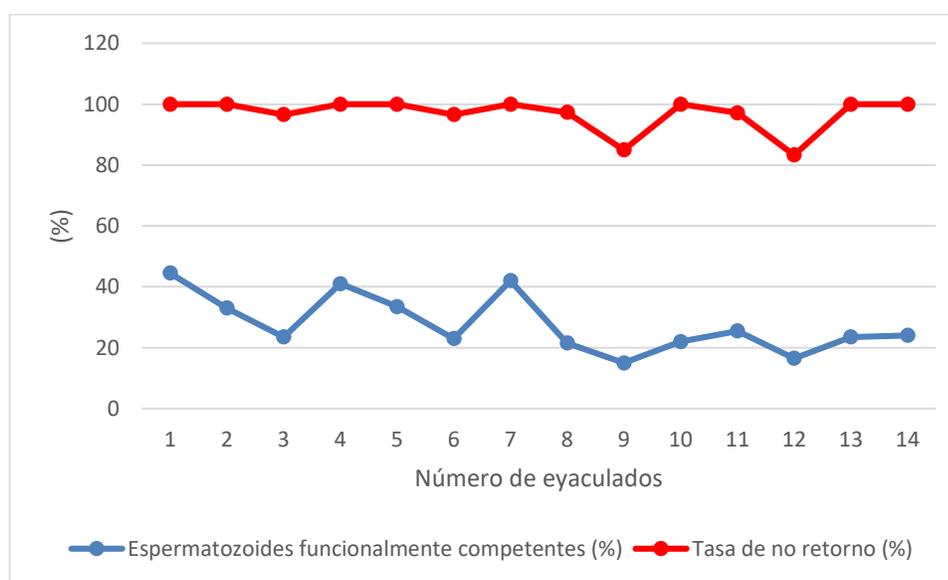
En la Tabla 2 se puede encontrar los resultados obtenidos de la evaluación de los eyaculados de los verracos seleccionados, aleatoriamente de las 3 granjas de estudio.

Evaluando el porcentaje de espermatozoides funcionalmente competentes, porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de membrana, y la respectiva la tasa de no retorno a celo en las cerdas obtenida para cada eyaculado.

El resultado obtenido fue que una de las muestras evaluadas refirió un estado de funcionalidad de espermatozoide de 15%,16.5%, correlacionando con un índice del 45%,40%, de vitalidad de su membrana, lo que es indicativo de un descenso en la tasa de no retorno en un 85%,83.3%. Lo que permite predecir el estado funcional, reproductivo del verraco número 79 y 82 que corresponde a la granja de Caldas. Los demás eyaculados se encontraban con promedio mayor o igual al 95% en relación positiva con la tasa de no retorno a celo en cerdas

**Tabla 2. Estadísticos descriptivos de las variables dependientes e independientes consideradas en el estudio.**

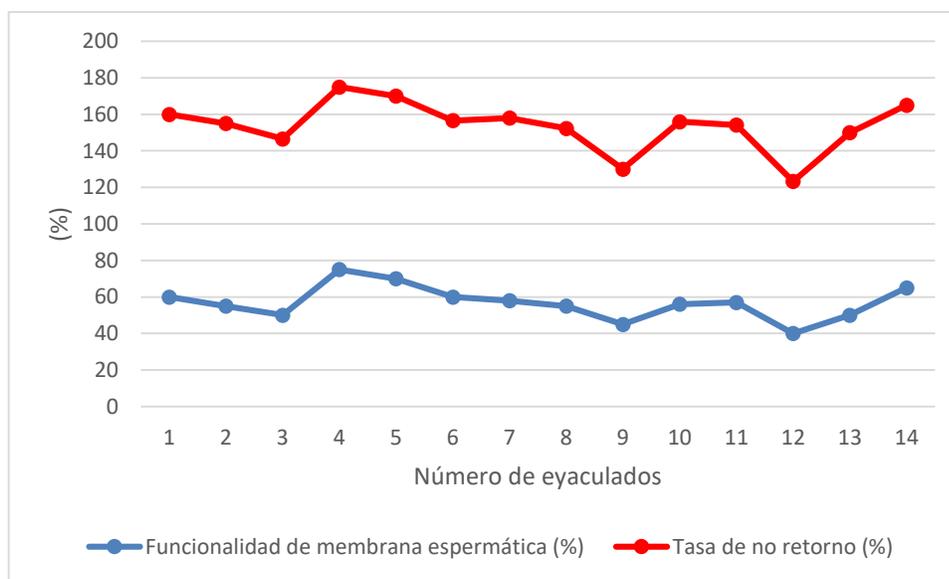
Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Desviación
<b>Espermatozoides funcionalmente competentes %</b>	14	15,00	44,50	27,7500	9,44162
<b>Funcionalidad de membrana espermática %</b>	14	40,00	75,00	56,8571	9,26413
<b>Tasa de no retorno%</b>	14	83,33	100,00	96,8550	5,56779
<b>N válido (por lista)</b>	14				



*Ilustración 20 Relación de la proporción de los espermatozoides funcionalmente competentes con la tasa de no retorno a celo en cerdas*

En la figura 17 se muestra la correlación entre espermatozoides funcionalmente competentes, con la tasa de no retorno a celo, con que se puede señalar una predicción positiva para las muestras 4,7 y para la muestra 9, 12; hay decrecimiento en las dos variables. Siendo indicativo que la prueba detecta las anomalías espermáticas y tienen influencia en el descenso de la tasa de no retorno a celo en cerdas.

Siendo de mayor importancia, ya que identifica un notable aumento en los espermatozoides funcionalmente competentes en un 42%, y una tasa de no retorno 100%, la cual aumenta las posibilidades de fertilización, para la muestra del verraco número 7 que corresponde a la granja ubicada en Cundinamarca



*Ilustración 21 Relación de la proporción de espermatozoides con funcionalidad de membrana con la tasa de no retorno en cerdas*

22 Figura Relación de la proporción de espermatozoides con funcionalidad de membrana con la tasa de no retorno en cerdas

La figura 18 muestra resultados obtenidos de la funcionalidad de membrana espermática, correlacionado con tasa de no retorno a celo, denotando un decrecimiento de las dos variables para las muestras 3, 9,12, lo que establece una relación dependencia al momento de predecir la tasa de no retorno a celo, la cual decrece significativa mente.

Las muestras: 4, 10,11 presentaron crecimientos en las dos constantes lo que permite predecir que los verracos ubicados en Cundinamarca y Caldas tiene una buena funcionalidad de membrana espermática, con esto se expresa un aumento en la tasa de no retorno a celo en cerdas, los demás datos se encuentran ubicados dentro de la media aritmética de predicción incluyendo las muestras de los machos del Cauca.

**Tabla 3 Resultados de análisis de correlación entre las variables de laboratorio y tasa de no retorno.**

		Correlaciones		
		Espermatozoides funcionalmente competentes %	Funcionalidad de membrana espermática %	Tasa de no retorno%
<b>Espermatozoides funcionalmente competentes %</b>	Correlación de Pearson	1	,655*	,633*
	Sig. (bilateral)		0,011	0,015
	N	14	14	14
<b>Funcionalidad de membrana espermática %</b>	Correlación de Pearson	,655*	1	,710**
	Sig. (bilateral)	0,011		0,004
	N	14	14	14
<b>Tasa de no retorno%</b>	Correlación de Pearson	,633*	,710**	1
	Sig. (bilateral)	0,015	0,004	
	N	14	14	14

\*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

\*\*.. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Hubo una correlación moderada de ( $r=0,655$ ) y significativa ( $P < 0,015$ ) entre Espermatozoides funcionalmente competentes, igualmente hubo correlación entre moderada-alta y significativa ( $P < 0,04$ ) entre Espermatozoides funcionalmente competentes ( $r = 0,633$ ) y entre Funcionalidad de membrana espermática ( $r = 0,710$ ) con la tasa de no retorno al celo.

Se probó el valor predictivo de las variables funcionalidad de membrana espermática (tabla 4 y 5) y espermatozoides funcionalmente competentes (Tabla 6 y 7), sobre la Tasa de no retorno mediante modelos de regresión con un R cuadrado ( $r^2$ ) 0,401 y 0,504, respectivamente.

**Tabla 4 Modelo de regresión lineal para la prueba de funcionalidad de membrana espermática a través del test HOST y la relación con la tasa de no retorno**

Resumen del modelo									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Estadísticos de cambio				
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
1	,710 <sup>a</sup>	0,504	0,463	4,08087	0,504	12,199	1	12	0,004

a. Predictores: (Constante), **Funcionalidad de membrana espermática %**

b. Variable dependiente: **Tasa de no retorno%**

**Tabla 5 Análisis de varianza del modelo de regresión lineal para la prueba de funcionalidad de membrana espermática**

ANOVA <sup>a</sup>						
Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
1	Regresión	203,162	1	203,162	12,199	,004 <sup>b</sup>
	Residuo	199,842	12	16,653		
	Total	403,004	13			

---

a. Variable dependiente: **Tasa de no retorno%**

---

b. Predictores: (Constante), **Funcionalidad de membrana espermática %**

---

**Tabla 6 Modelo de regresión lineal para la prueba de espermatozoides funcionalmente competentes y la relación con la tasa de no retorno.**

Resumen del modelo <sup>b</sup>									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Estadísticos de cambio				
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
1	,633 <sup>a</sup>	0,401	0,351	4,48558	0,401	8,030	1	12	0,015

a. Predictores: (Constante), **Funcionalidad de membrana espermática %**

b. Variable dependiente: **Tasa de no retorno%**

**Tabla 7 Análisis de varianza del modelo de regresión lineal para la prueba de espermatozoides funcionalmente competentes**

ANOVA <sup>a</sup>						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	161,559	1	161,559	8,030	,015 <sup>b</sup>
	Residuo	241,445	12	20,120		
	Total	403,004	13			

a. Variable dependiente: **Tasa de no retorno%**

b. Predictores: (Constante), **Funcionalidad de membrana espermática %**

## 23 Discusión

La fertilidad del ganado porcino es una de las marcas de productividad y de la potencia reproductiva, significa en la cerda la capacidad de producir una descendencia variable en número adecuado y en un período conveniente. En los verracos la buena

fertilidad, se caracteriza por la habilidad o poder de fecundar el máximo número de hembras (Cintra et al., 2006). La fertilidad es considerada el aspecto económico más importante en una producción porcina, pues todas las funciones de los animales están ligadas a su capacidad reproductora (Cintra et al., 2006).

Numerosos son los factores que influyen en la fertilidad pudiendo considerarse dos grupos de ellos: Internos se considera la edad, prolificidad de la raza y los externos que influyen en la fertilidad estado fisiológico, nutrición, ambiente, ejercicio y la utilización de los animales reproductores (Cintra et al., 2006).

Nuestros resultados confirman una correlación significativa bilateral ( $p < 0,05$ ) de los espermatozoides competentes y número de vivos en eyaculados de verracos ubicados en los departamentos de Cundinamarca, Caldas, Cauca, Colombia. Estudios de campo realizados por (Wang et al., 2019), han demostrado importantes variaciones en la calidad del semen que llevan a su categorización: aprobándolos, desaprobándolos, por características particulares como: colas enrolladas, gotas citoplasmáticas, que son remanentes del germen del citoplasma celular, que migran a lo largo de la pieza intermedia desde el cuello al anillo durante el transporte al epidídimo proximal. En el presente estudio, se logró establecer que hay correlación moderada ( $k=0,655$ ), entre las pruebas de (EFC, espermatozoides funcionalmente competentes) y (HOST, funcionalidad de membrana espermática), que cumple con las características predicción de fertilidad del verraco y de la tasa de no retorno a celo en cerdas.

La edad muestra una relación positiva con la motilidad total de los espermatozoides morfológicamente anormales en un 99.9 % mediante el método logarítmico lineal, referido por (Kuhlgatz et al., 2019), que afirma que aumenta en periodos después de múltiples tomas de muestras de semen en animales jóvenes, Lo que se pudo correlacionar con la regresión obtenida de la agrupación de los datos. Gracias al método descrito, se puede afirmar que es preciso en el grado de correlacionar las variables de dependientes como la tasa de no retorno a celo y las variables independientes como espermatozoides funcionalmente competentes, funcionalidad de membrana que tienen una directa influencia en el retorno a celo de las cerdas servidas con el macho 89, el cual no se pudo establecer la frecuencia de colectas y su edad.

Los factores ambientales son asociados con la producción de eyaculado; en general, la evaluación de los parámetros, como morfología, motilidad, concentración, volumen, permite la identificación de las muestras con una baja fertilidad. Lo cual no se pudo predecir en el presente estudio. En lo que ha descrito por (Gadea, 1997) que describe que hay una correlación positiva entre el contenido de ATP, AMPc que modulan la motilidad e inhiben la espermatogénesis en el verraco; pero no ofrece una predicción de alta eficiencia en campo.

El desarrollo de nuevas pruebas a los espermatozoides que permiten medir ciertas funciones, se han intentado complementar las técnicas existentes: mediante la prueba combinada que evalúa varias características de los espermatozoides, tuvo una correlación alta con la tasa de no retorno, esto coincide con la investigación realizada por (Ruiz-Sánchez et al., 2006), donde encontraron que la fecundidad in vitro tubo una alta relación, con la fertilidad en campo mientras que la motilidad no; pero efectivamente es posible

que la prueba tenga una alta correlación con la identificación de los espermatozoides capaces de fecundar el ovocito.

La categorización de espermias vivos y muertos en los eyaculados e identificación de espermatozoides funcionalmente competentes y su funcionalidad membrana. Fueron correlacionadas con los resultados obtenidos en el presente estudio, evidenciando que uno de los machos refirió un porcentaje de espermatozoide funcional mente competente 16,5% y su relación con la funcionalidad de membrana, con un 40% tuvo directa incidencia en el decrecimiento en un 83,3% en la tasa de no retorno a celo en cerdas, lo que se puede relacionar a la investigación realizada por (Jung et al., 2015), que revelo correlaciones negativas significativas entre la porción de gotas citoplasmáticas distales en el semen extendido, la tasa de preñez y tamaño de la camada, cuando los espermias se almacenan durante periodos de más de 4 días.

Se ha descrito que especies politocas como la porcina, la prolificidad está fuertemente influenciada por un gran número de factores que afectan a la hembra, tales como el potencial genético, la raza, la tasa de ovulación, el momento de la ovulación y la IA, las perdidas embrionarias (Gadea, 1997). Lo que se verifico con el resultado obtenido que relaciona, las cerdas servidas con este macho, presentaron celo a los 18 días pos inseminación. Lo cual permite establecer que la prueba de laboratorio hipo osmótica o de sHOST, en combinación con Fluoresceína 5-isotiocianato o marcaje PI/FITC-PNA y fijación con solución formolada sea, una herramienta de utilidad, para predecir la fertilidad en el verraco y la tasa de no retorno a celo en las cerdas.

## 24 Conclusiones

- La prueba doble combinada hipoosmótica o de sHOST, en combinación con Fluoresceína 5-isotiocianato o marcaje PI/FITC-PNA y fijación con solución formolada, permitió identificar en una sola evaluación los espermatozoides potencialmente útiles para predecir la fertilidad del verraco.
- Se logró identificar de forma rápida y simultánea el estado de la membrana plasmática y su permeabilidad, obteniendo un dato de gran importancia a la hora de seleccionar los verracos, para ingresarlos a los programas de inseminación artificial y evaluar espermatozoides sometidos a procesos que pudiesen alterar las membranas, como el refrigerado o la congelación, entre otros.
- Que es una prueba de laboratorio económica para el productor y además los resultados de la misma no se demoran y permiten una correlación veras con los parámetros productivos y reproductivos evaluables en campo, en comparación de otras pruebas laboratorio, que requieren de más procesos y sus costos son muy elevados para el pequeño y mediano porcicultor.
- Se hace necesario realizar más investigaciones referentes con la permeabilidad de membrana en el espermatozoide porcino mediante la técnica doble combinada, para predecir su sensibilidad y especificidad y dar un diagnóstico más concreto del estado reproductivo del verraco a utilizar en las granjas.
- Se hace necesario realizar un estudio detallado de los factores asociados, a la desnaturalización de las muestras y su incidencia en la presentación de falsos positivos en la prueba combinada.

## 25 Referencias

- Arenas, E., Cambron, A., Ambriz, D., Zuñiga, P., Rodriguez, A., & Rosado, A. (2010). Bases fisiologicas de la capacitacion y de la reaccion acrosomal del espermatozoide. *Contactos*, 78, 5–11.  
<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/fisiologica.pdf>
- Cintra, M., García, L., Hernández, Y., & Pérez, M. (2006). Características reproductivas de la cerda. *Redvet*, VII(1), 1–36.
- Cuenca Condoy, M., & Avellaneda Cevallos, J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Revista Electronica de Veterinaria*, 18(9).
- 1991.Editorial Medica Panamericana S.A, Marcelo T. de Avelar 2145- Buenos Aires, Libermed Verlag , K. M. Dyce & W.O.Sack & C. J. G. Wensing. Anatomia veterinaria, (p.785 a 792).
- Gadea, M. J. (1997). Predicción De La Fertilidad “in Vivo” De Los Eyaculados De Verraco Mediante Parámetros Rutinarios De Contrastación Seminal, Pruebas Bioquímicas Y El Test Homólogo De Penetración “in Vitro.” *Test*, 116.
- Galina, C., & Valencia, J. (2008). Reproducción de los animales domésticos. In *Limusa* (p. 582).

- INTA. (2006). Estacion xperimental los diamantes centro de cria y produccion porcina  
Costarica. *Detección de celo en cerdas* (p. 6).  
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-0894.PDF>
- Jeyendran, R. S.; Van der Ven, H. H; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B. G.; Zaneveld, L. J. D.  
1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human  
sperm membrane and itsrelationship to other semen characteristics. *Journal  
Reproduction and Fertility*, 70:219-228
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for  
acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1: 63-68.
- Ramírez, F. D. (2006). *Manual de Explotacion y Reprodu - Desconocido (1).pdf*.
- Shelford, G., Medicine, V., & Foundation, H. (2022). *Vías de señalización implicadas en  
el control del volumen de espermatozoides*. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01137>
- Silva, P.F.N. and Gadella, B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm  
cells. *Theriogenology*, 65: 958-978.
- Roa, N.; Tamasaukas, R.; Silva, A.; Sánchez, J. 2005. Criopreservación de semen suino  
en Venezuela. Una revisión. (en línea). *Revista Electrónica de Veterinaria  
REDVET/ 6 (3)*. Consultado 18 sep. 2013. Disponible en:  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505/050504.pdf>
- Suhevic, J. (2015). Determinación de la calidad de las membranas espermáticas porcinas  
mediante triple tinción fluorocrómica en semen fresco y refrigerado. *Spermova*,  
5(1), 134–138. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.30>

- Torrentes, R., Kairo, T., Julio, L., & Luis, G. (2013). *Manual de inseminación artificial porcina*. 87.
- Valencia, J., Yeste, M., Quintero-Moreno, A., & Henao, F. J. (2019). A new test based on the hypotonic resistance and functional competence to evaluate the sperm quality, cryotolerance and in vitro fertilizing ability in pigs. *Theriogenology*, *140*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.022>
- Valencia, J., Yeste, M., Quintero-Moreno, A., Niño-Cardenas, C. del P., & Henao, F. J. (2020). Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, *145*(xxxx), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.023>
- Waberski, D., Luther, A., Grünther, B., Jäkel, H., Henning, H., Vogel, C., Peralta, W., & Weitze, F. (2019). *Función espermática in vitro y fertilidad después del almacenamiento hipotérmico sin antibióticos de verraco en conserva líquida semen*. 1–10.
- Yeste, M. (2015). Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*(Suplemento 2), 71–79. <https://doi.org/10.1111/rda.12569>

