



**EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD Y RESISTENCIA OSMÓTICA DEL
ESPARMATOZOIDE Y SU CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA FERTILIDAD EN
CAMPO EN PORCINOS**

DYANNE ALEJANDRA BELALCÁZAR

Universidad Antonio Nariño
Facultad De Medicina Veterinaria
Programa De Medicina Veterinaria
Popayán – Alto Cauca

2022

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD Y RESISTENCIA OSMÓTICA DEL
ESPARMATOZOIDE Y SU CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA FERTILIDAD EN
CAMPO EN PORCINOS**

DYANNE ALEJANDRA BELALCÁZAR ENRIQUEZ

Trabajo presentado como requisito para optar al título de:

Médico Veterinario

Director:

Julian Valencia Giraldo

MVZ, MSc, PhD

Línea de investigación:

Biología de la reproducción animal

Universidad Antonio Nariño

Programa de Medicina Veterinaria

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Popayán

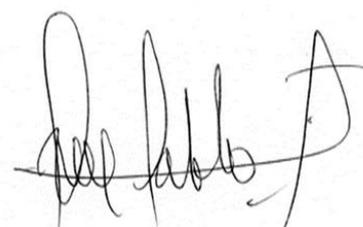
2022

Página de Aceptación

Aprobado por el jurado evaluador en cumplimiento de los requisitos exigidos

por la Universidad Antonio Nariño para optar al título de

Médico Veterinario



MV, Esp. Juan Pablo Andrade Valencia

Jurado evaluador

Julian A. Valencia G.

MVZ, MSc, PhD. Julian Valencia Giraldo

Director

DEDICATORIA

Llegar hasta este punto, a un paso de graduarme como Médico Veterinaria de esta Universidad, que me ha hecho crecer como persona y me ha preparado por estos años para ser una profesional con ética y valores médicos; el lugar que se convirtió en mi segundo hogar, donde aprendí los conocimientos que hoy tengo para desempeñarme como profesional.... No ha sido fácil, y no lo hubiese logrado sin el apoyo de mis padres Juan Alejandro y Arelis, de mi hija Inés Mariana, que se convirtió en la razón de mi existencia, de mis abuelos, y sobre todo, no lo hubiera hecho sin Dios, porque nunca me ha soltado de su mano y me ha enseñado que en medio de las adversidades también se aprende.

A los profesores, compañeros, y a todos aquellos que en cada uno de mis pasos han estado ahí, pero sobre todo porque siempre sacaron tiempo para discutir temas que en un salón de clase no se lograba, sembrando inquietudes y llevándome a leer e investigar... claro, no se puede dejar de agradecer al profesor Julián, quien me dio la oportunidad de aportar a su gran investigación y me permitió ser parte de su equipo.

A mis profes Daniel y Diana, que con todo el amor y profesionalismo me enseñaron que antes que cualquier cosa, debo ser una persona de ética y valores. Que más que una estudiante, fui hija para ellos y me apoyaron en todo lo que estuvo a su alcance, me enseñaron con mucha paciencia cosas que aún no sabía y complementaron la persona que soy hoy.

TABLA DE CONTENIDO

<u>INTRODUCCIÓN</u>	9
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	11
<u>OBJETIVOS</u>	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<u>METODOLOGÍA</u>	13
<u>ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN</u>	14
MARCO TEÓRICO - INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
GENERALIDADES DEL SISTEMA REPRODUCTIVO DEL VERRACO.	15
EL ESPERMATOZOIDE PORCINO.	17
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DEL VERRACO	20
PREDICCIÓN DE LA FERTILIDAD EN EL VERRACO	22
Índices productivos y reproductivos evaluables en la producción porcina tomado de (Martínez &Ramírez, 2010).	23
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	24
INVESTIGACIÓN DE CAMPO	25
PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS .	27
PROCEDIMIENTO – PROTOCOLO	28
Desarrollo De Las Pruebas De Resistencia Y Funcionalidad Espermática: Prueba de espermatozoides funcionalmente competentes (EFC)	28
LA PRUEBA CONSISTIÓ EN UNA COMBINACIÓN DEL SHOST, MARCAJE CON PI/FITC-PNA Y FIJACIÓN CON SOLUCIÓN FORMOLADA	28
Preparación de la suspensión, incubación y fijación	30

PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA	30
RESULTADOS	33
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN	36
<u>DISCUSION</u>	<u>42</u>
<u>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	<u>44</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>45</u>

RESUMEN

La predicción de preñez dentro del campo porcino se puede dar, a partir de la aplicación de una técnica de laboratorio consistente en la combinación de sHOST, marcaje con pi/Fitc-Pna y fijación con solución formolada, el cual permite distinguir y cuantificar fácilmente los Espermatozoides Funcionalmente Competentes (EFC), es decir: vivos, con funcionalidad bioquímica de la membrana, con resistencia acrosómica, sin anomalía de cabeza y tracto intermedio, sin gotas citoplasmáticas y no aglutinados. 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 este osmótico; y la fijación con la solución formolada permite evidenciar los espermatozoides con formas anormales.

Los análisis de laboratorio fueron realizados en 14 muestras de eyaculados de diferentes granjas porcinas a nivel nacional, permitiendo analizar la funcionalidad espermática por estrés hipoosmótico y evaluación de integridad de membranas, utilizando una correlación con los partos de las hembras reproductoras inseminadas, utilizando un análisis estadístico, con un porcentaje de preñez del 14.62 % y con un promedio de efectividad del 90% en 45 hembras preñadas, con una pérdida de tres hembras o cero partos que equivale al 6% del total de las hembras. Arrojando como conclusión principal que no se puede predecir el porcentaje de preñez de las hembras en el campo porcino, a partir de un análisis de laboratorio de eyaculados, manteniendo el líquido seminal en congelación a una temperatura promedio de 16 °C y llevándolo a un procedimiento de laboratorio hasta una temperatura de 34 °C, dado que, los EFC presentaron una tendencia de relación con el número de lechones nacidos totales, pero esta no fue significativa, por lo que se recomienda aumentar el número de muestras para corroborar información.

PALABRAS CLAVE: Reproducción, porcinos, espermatozoide

ABSTRAC / KEYWORDS

The prediction of pregnancy within the pig field can be given, from the application of a laboratory technique consisting of the combination of sHOST, marking with pi/Fitc-Pna and fixation with formolate solution, which allows to easily distinguish and quantify the Functionally Competent Spermatozoa (EFC), that is: alive, with biochemical functionality of the membrane, with acrosomic resistance, without abnormality of head and intermediate tract, without cytoplasmic drops and not agglutinated. The combination of sHOST and marking with PI and FITC-PNA allows evidence of the proportion of living cells, with membrane functionality and acrosomic resistance after osmotic stress; and fixation with formolade solution allows to show sperm with abnormal shapes.

Laboratory analyses were performed on 14 ejaculate samples from different pig farms nationwide, allowing analysis of sperm functionality by hypoosmotic stress and evaluation of membrane integrity, using a correlation with births of inseminated breeding females, using a statistical analysis, with a pregnancy rate of 14.62% and an average effectiveness of 90% in 45 pregnant females, with a loss of 3 females or 0 births equivalent to 6% of all females.

The main conclusion being that the pregnancy rate of females in the pig field cannot be predicted from a laboratory analysis of ejaculates, keeping the seminal liquid frozen at an average temperature of 16 °C and taking it to a laboratory procedure up to a temperature of 34 °C, as CFEs showed a trend in relation to the number of total piglets born, but this was not significant and it is therefore recommended to increase the number of samples to corroborate information.

KEYWORDS: Reproduction, spermatozoon, pigs

INTRODUCCIÓN

Hablar de espermatozoides, fertilidad en la reproducción porcina, resulta compleja como sus los mismos cambios hormonales que sufre el verraco y la hembra, teniendo en cuenta que este proceso provoca transformaciones físicas y comportamentales en los individuos para lograr un único fin reproducirse.

El primer cambio que se debe producir es la maduración sexual de los animales, partiendo del establecimiento de los órganos sexuales o reproductores y la formación de gametos o espermatogénesis.

Para que la reproducción sea eficiente se tienen en cuenta ciertos parámetros como el clima, alimentación, fertilidad, entre otros, siendo la fertilidad en hembras y machos uno de los factores más importantes a evaluar en la reproducción animal. En los animales, se sabe que fertilidad es la unión del espermatozoide y el ovulo en el interior de los dos conductos de la hembra que conectan sus respectivos ovarios.

Dentro de la especie animal para la alimentación humana los porcinos tienen un mayor número de crías por cada parto, además, mayor número de partos al año, es una de las especies que mayor incremento de población alcanza, siendo este factor importante para la generación de ingresos de las granjas porcícolas. Hasta ahora, las granjas que se dedican al manejo, producción y reproducción de la especie, se les hace necesario alcanzar tasas de fertilidad del 85 al 90% donde producen camadas de 12 a 15 lechones nacidos vivos, que les permita llegar a niveles adecuados de eficiencia productiva, un parámetro que hace esperar a los porcicultores un buen número de lechones destetados por camada que alcancen un alto peso al destete. Según el censo pecuario de 2021 del ICA la población porcina en el país estaba distribuida en 208.828 predios de los cuales 169.572 (81,2%) son predios de traspatio y los restantes 39.250 (18,8%) corresponden a predios de producción comercial y tecnificada. El número total de animales censados para este año fue de 5.950.113 animales, reduciéndose en un 11,3%, respecto al año

2020, de los cuales el 76,9% son animales de predios de producción comercial y tecnificada, y el restante 23,1% son animales de traspatio. El 68,6% del total de la población porcina del país se concentra en seis departamentos, Antioquia (37,9%), Valle del Cauca (9,3%), Bolívar (6,3%), Córdoba (5,9%), Cundinamarca (5,5%) y Magdalena (3,7%).

La fertilidad se evalúa en la hembra y en el verraco, siendo este último evaluado por su calidad seminal, antes de usarlo en un grupo determinado de hembras es importante saber su nivel de fertilidad, para esto, evaluamos su aptitud reproductiva y la calidad seminal. Es así como por medio del espermiograma de manera rutinaria, valoramos la determinación del volumen, aspecto (color, contaminación, pH, temperatura, etc), supervivencia, motilidad progresiva, Shost, morfología, integridad acrosómica y espermatozoides funcionalmente competentes.

La investigación busco evaluar la funcionalidad y resistencia osmótica del espermatozoide y su capacidad predictiva de la fertilidad en campo en porcinos, buscando de esta forma coadyuvar al aumento de la eficiencia productiva.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a Diaz y Mesa (2009), “el reducido control sobre la calidad seminal de cerdos (*Sus scrota*) reproductores amenaza la productividad y la competitividad de la industria porcina por la variabilidad inducida en tamaño de camada y tasa de partos. La complejidad de los factores que intervienen en la biología de la fecundación es determinante para cualquier predicción respecto al uso de semen, entre estos factores están: medio ambiente, nutrición, sanidad, momento de la inseminación y calidad seminal. Este último factor ha sido asociado al tamaño de camadas y a la tasa de partos”. En consecuencia, un mal desempeño reproductivo del macho afecta de manera relevante la rentabilidad de la granja.

Actualmente no existen pruebas de laboratorio que permitan predecir de manera confiable la fertilidad de un eyaculado dado, generando pérdidas económicas al utilizar en inseminación artificial semen de calidad desconocida que puede resultar en problemas de número de lechones nacidos y cantidad de cerdas preñadas. Lo anterior muestra claramente que la estandarización de técnicas de laboratorio de bajo costo para evaluar la funcionalidad y resistencia osmótica del espermatozoide, y adicionalmente la estimación del potencial predictivo de la fertilidad de las mismas es de crucial importancia para la industria.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la relación entre la funcionalidad y resistencia osmótica del espermatozoide y su capacidad predictiva de la fertilidad en campo en porcinos.

Objetivos Específicos

- Establecer una técnica de laboratorio para el análisis de la funcionalidad espermática mediante exposición a estrés hiposmótico y evaluación de integridad de membranas con marcaje con yoduro de propidio y aglutinina de maní ligado a FITC.
- Comparar los niveles de funcionalidad espermática después de estrés hiposmótico con los porcentajes de tasa de parto post inseminación.
- Comparar los niveles de funcionalidad espermática después de estrés hiposmótico con el tamaño de la camada.

METODOLOGÍA

Esta investigación busco evaluar la determinación de población de espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) en semen porcino, mediante una técnica que combina: el test corto de hinchazón hipoosmótica (sHOST) para evaluar la funcionalidad bioquímica de la membrana, la coloración con Yoduro de propidio (PI) y FITC-PNA para evaluar supervivencia espermática e integridad acrosómica, y fijación con solución formolada para evaluación de la morfología espermática. Lo anterior mediante el uso de dos técnicas de microscopía: la fluorescencia y el contraste de interferencia. Los resultados relacionados pueden ser empleados en diversas disciplinas y actividades relacionadas con la producción porcina.

Tipo de Investigación: Experimental predictiva.

Línea de investigación: Biología de la reproducción animal.

Universo y 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.

Etapas De La Investigación

El desarrollo de la investigación se realizó teniendo en cuenta las etapas concebidas para para este tipo de investigaciones, partiendo de una revisión bibliográfica que determina el marco teórico de la investigación y se centra en los aportes investigativos realizados, con las siguientes etapas.

Marco Teórico - Investigación Bibliográfica

El Marco teórico esta construido por los aportes propuestos por investigaciones en la funcionalidad y resistencia osmótica del espermatozoide y su capacidad predictiva de la fertilidad en campo en porcinos, investigaciones que han llevado al mejoramiento reproductivo de la producción porcina, tanto en Colombia como a nivel internacional, autores como Julian Valencia, Francisco Javier Henao, J. Gadea, Valeria Arango, Alexei del Valle y J Garcia entre otros, han realizado aportes a la investigación reproductiva en el sector porcino.

Según Arango (2019) en evaluación de parámetros productivos y reproductivos en granjas porcícolas determina que, “dentro de los parámetros productivos y reproductivos en porcicultura, el manejo de una gran cantidad de cerdos, requiere tener indicadores productivos, y parámetros a evaluar de manera general, por ciclo productivo, por lotes de animales y de manera individual para las hembras de cría; la información recopilada de los indicadores productivos permite tener conocimiento sobre la eficiencia de la explotación pecuaria , revelando las debilidades presentes y en base a esto guiar la toma de decisiones en el manejo que conlleven a obtener un mayor margen de ganancia”.

Por lo anterior, la determinación de población de espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) en semen porcino, se convierte en una herramienta fundamental para generar un mayor margen de rentabilidad en las granas productoras. Los parámetros reproductivos de la calidad de semen deben tener en cuenta variables como: la edad del verraco, la estación, el nivel

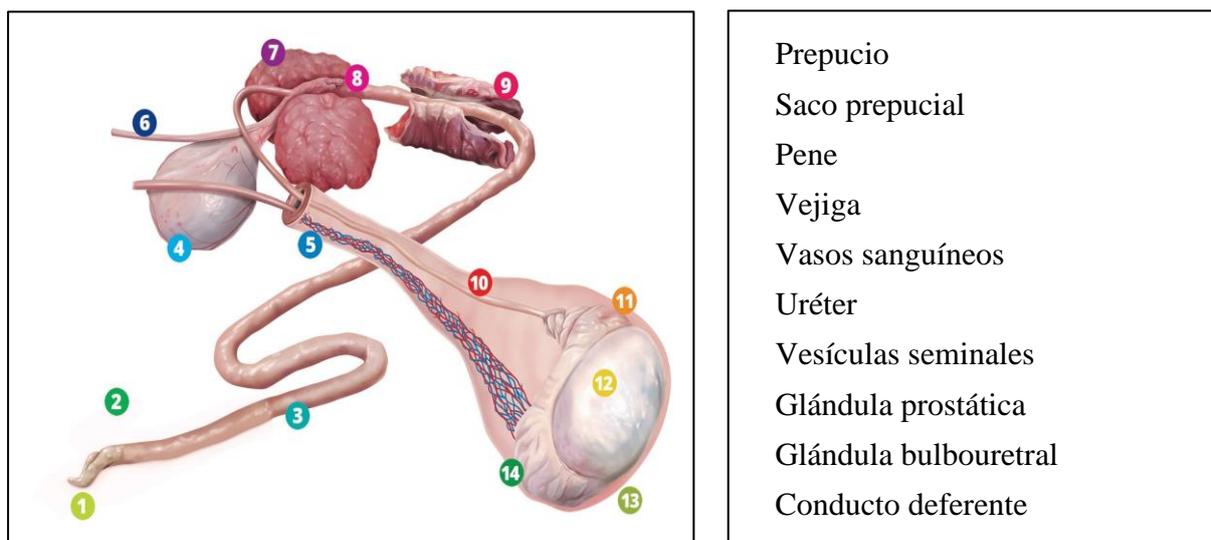
nutricional, la presencia de enfermedades intercurrentes, el manejo, las interacciones sociales y otros factores ambientales que puedan afectar su fertilidad. Su aptitud reproductiva depende primariamente de la salud general y su bienestar, y -específicamente- de la función de su sistema endocrino y de sus testículos, su tracto genital y sus glándulas sexuales accesorias, todo lo cual incide en la eficiencia de su capacidad de servicio. Parámetros que se tuvieron en cuenta para la investigación realizada en campo.

El proceso de producción de semen de los cerdos o espermatogénesis es considerado según Andrés Salazar Caraballo (2017) como un proceso largo y dirigido en el cual las células madres diploides, ubicadas dentro de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis para mantener su número y de forma cíclica generan progenie que sufren progresivas divisiones meióticas hasta diferenciarse en espermátidas haploides.

Generalidades Del Sistema Reproductivo del Verraco.

Los testículos o gónadas tienen una de las funciones más importantes dentro de la reproducción porcina, y hace referencia a la función citógena o producción de espermatozoides y la producción de hormonas sexuales masculinas.

Figura 1. Tracto reproductor del verraco



Fuente: <https://magapor.com/actualidad-tecnica/anatomia-del-verraco/>

De la misma forma el escroto cumple con la protección y regulación de la temperatura 3-4 grados centígrados, la cual debe ser inferior al resto del cuerpo, el cambio de la temperatura en el escroto produce problemas durante la espermatogénesis y la maduración espermática la cual se ocasiona en el epidídimo.

La unidad productora se encuentra en los testículos, los cuales están compuestos por túbulos seminíferos en donde se forman las células espermáticas y los cuales organizados en lóbulos. Los túbulos están tapizados por un epitelio seminífero formado por: **Las células de Sertoli** cumplen la función de nutrir y proteger las células germinales, encargadas de la diferenciación sexual y la espermatogénesis. La maduración de las células Sertoli se produce por la FSH, la cual es producida en la hipófisis. Las células de Sertoli dejan de dividirse antes de la pubertad la cual puede ocurrir entre los 5 y 8 meses de edad, para los científicos de la empresa Magapor avalada por la universidad de Zaragoza, establece que el número de células determinará la producción espermática futura, ya que sin el soporte estructural y metabólico de estas células las células germinales no podrían realizar la espermatogénesis. Por esta razón la medición del tamaño testicular en la etapa pre púber es tan importante a la hora de seleccionar verracos para producción.

Así mismo, se encuentran las células **de Leydig o esteroideogénicas**, tienen la capacidad de sintetizar y secretar esteroides, enzimas y péptidos y son las responsables de la producción de testosterona, la capacidad de producción de testosterona va ligada a la cantidad de retículo endoplasmático liso presente en las mismas. Además, son responsables de la diferenciación sexual, crecimiento testicular y aparición de los caracteres sexuales masculinas secundarias y estructuras andrógeno dependientes y la espermatogénesis en el verraco.

Células Germinales: son la responsable de la formación de los túbulos seminíferos el número de células germinales en el testículo aumenta de manera continua, con un pico de división a los 4-5 meses y una estabilización de la población a partir de los 7. Estas células son las encargadas

de realizar la espermatogénesis, a través de una serie de misiones mitóticas, seguidas de una serie de divisiones meióticas que terminan con el resultado de una *célula haploide*.

Los espermatozoides son transportados por los túbulos que conforman los testículos y desembocan en la rete testis a través de los conductos eferentes, hasta depositarlos en la cabeza del epidídimo, una los espermatozoides se encuentren en la cabeza del epidídimo empieza la maduración epididimaria.

La función de transportar, madurar y almacenar los espermatozoides la cumple el **Epidídimo**, el cual es un tubo único contorneado sobre sí mismo, presenta tres partes según su posición anatómica y su función: cabeza, cuerpo y cola. Durante este proceso de maduración, el espermatozoide adquiere la capacidad de movimiento y fecundante. Esta maduración ocurre principalmente en su tránsito por la cabeza y cuerpo del epidídimo. Este transporte ocurre debido a los movimientos peristálticos del conducto. Los cambios en la célula espermática no van a ser solo morfológicos, si no también bioquímicos y fisiológicos al interactuar con las secreciones del epidídimo. La cola del epidídimo es conectado con la uretra a través del **conducto deferente**, el cual tiene como función impulsar los espermatozoides en la eyaculación. A lo largo del conducto se encuentra el **Conjunto de glándulas accesorias**, cuya actividad depende de la excreción de andrógenos y se encargan de la producción de la fracción no espermática del eyaculado (plasma seminal).

El 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

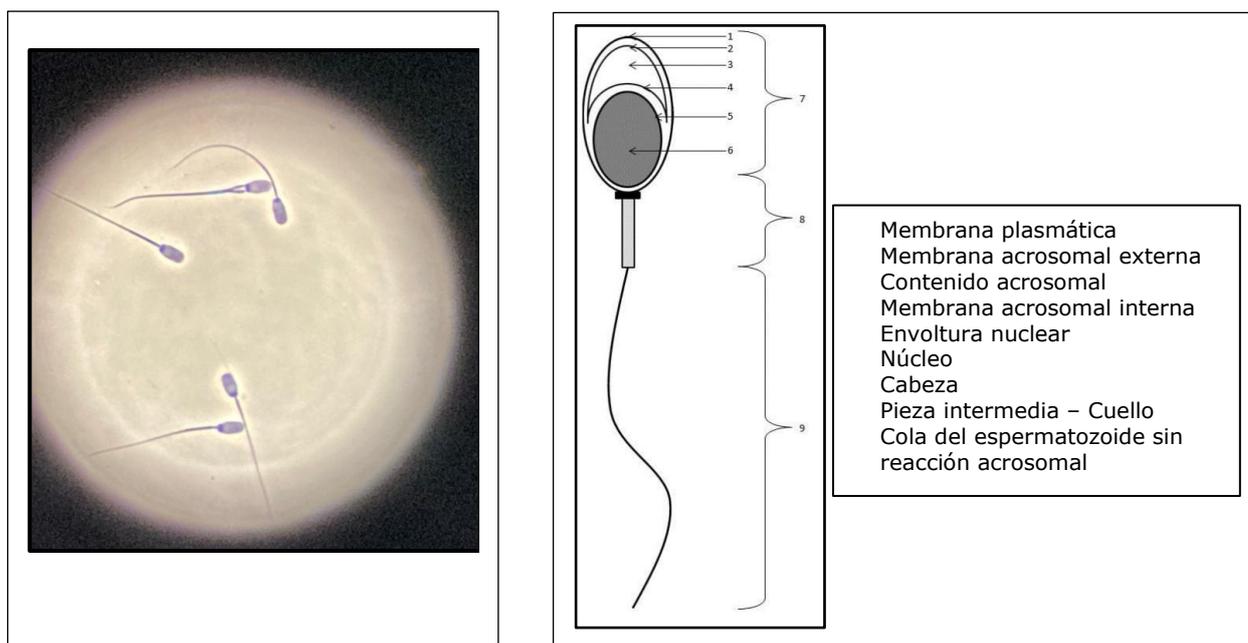
con la cantidad relativamente baja de moléculas de colesterol que, durante el enfriamiento, conduce a la separación de fase lateral de los lípidos y la agregación irreversible de proteínas con la pérdida de la permeabilidad selectiva. La acción protectora y la capacidad de estas proteínas de prevenir la capacitación de los espermatozoides; se conocen como factores de descapacitación y pueden influir en la crio tolerancia de los espermatozoides; se ha establecido que las cantidades relativas de proteínas presentes en el plasma seminal PS (Fibronectina 1, FN1); infieren 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 crio 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 crio preservación, dados los cambios osmóticos drásticos que allí ocurren por la crio 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 crio 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).

Figura 2

Espermatozoides de un verraco



Fuente: Propia de la investigación, Laboratorio Universidad de Caldas, 2022

Fuente: Evaluación de la viabilidad de semen porcino Tratado con estreptolisina o (slo)

El espermatozoide del verraco son células alargadas, de forma plana, que se forman dentro de los túbulos semíferos, son dinámicos y especializados, según Madahi Sánchez un espermatozoide normal tiene 44 - 50 μm de largo (esto es cerca de 0.0045 cm), dividido en cabeza, cuello y cola (2019), así, autores como Arenas señalan que el cuello hace parte del flagelo señalando que el espermatozoide está dividido en dos partes cabeza y flagelo (2010).

La cabeza, donde está contenido el ADN (núcleo haploide) y los mecanismos para el reconocimiento y subsecuente fusión con el ovocito (acrosoma) con una medida de 7 μm . La cabeza es determinado como el núcleo, el ADN es 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 espermatogénesis 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 capsular 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).

El flagelo o cola, 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 del espermatozoide se describe como la unión entre el flagelo y la cabeza, según Sanchez cuenta con una medida de 0,7 a 1 μm , va desde la base del núcleo hasta la primera mitocondria de la pieza intermedia, en el se encuentra la placa basal, los cuerpos laminares, capitulum, columnas segmentadas, así mismo, contiene la estructura para el movimiento del flagelo a la cabeza, de la misma forma que contiene el centriolo a partir del cual se lleva a cabo la primera división mitótica tras la fecundación (2019). La parte terminal de la cola es una vaina fibrosa, cada parte del flagelo tiene funciones específicas en el movimiento, reconocimiento del ovocito y la fecundación.

Principales Características del Semen del Verraco

González Martínez, señala que existen variables que son importantes en la calidad del semen porcino como: **pH seminal**. Es un importante indicador de calidad seminal. Al momento de la colecta, un pH mayor a 8 puede indicar baja calidad en el esperma o la presencia de un proceso infeccioso en el tracto genital o en las glándulas accesorias. El pH en el semen del cerdo, se encuentra en un rango de $7,69 \pm 0,33$.

Color Seminal. El color normal del semen porcino es blanco, con tonalidades grises o azuladas; aunque puede presentar otras tonalidades como son amarillenta, rosácea, marrón y verdosa. Estas tres últimas, pueden obedecer a patologías reproductivas.

Aspecto seminal. Por aspecto del semen, se entiende su consistencia normal y color. El aspecto depende del número de espermatozoides/ml, componentes de secreción de las glándulas accesorias y de eventuales agregados como: sangre, pus, células epiteliales y contaminación externa (2017).

Así mismo, establece las características y parámetros principales en el semen de un verraco.

Tabla 1.

Características del Semen del Verraco

Característica	Medias
Volumen (ml)	100 – 500
Concentración (millones/ml)	200 – 350
Motilidad (%)	
Motilidad Masal	70 – 80
Motilidad Individual	80 – 90
Motilidad Progresiva	> 70
Morfología(%)	
Espermatozoides Normales	70 – 90
Espermatozoides Con Defectos De Cabeza	5
Espermatozoides Con Defectos De Cola	15

Espermatozoides Con Defectos De Gota Citoplasmática	10
Vitalidad (%)	
Viables	>75
No Viables	<25
pH	7,3 – 7,8
Aspecto	Blanco lechoso
Color	Blanco con tonalidades grises, azuladas o amarillentas

Fuente: <https://laporcicultura.com/reproduccion-porcina/espermatogenesis-en-cerdos/>

Predicción de la fertilidad en el verraco

Para predecir que un eyaculado de un verraco es fértil, se evalúan parámetros bioquímicos como la tinción vital. La cual evalúa morfoanomalias 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 mencionarán aspectos complementarios que permitan predecir la fertilidad de un verraco, ya que su evaluación se realiza directa mente en campo.

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 multíparas 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 anomalía 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.

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).

Investigación de Campo

La recolección de las muestras se realizó mediante donación de granjas productoras de los departamentos de Cauca, Caldas y Cundinamarca, las 14 muestras analizadas en el laboratorio permitió obtener resultados en reproducción en 115 días.

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 30×10^6 ml en dosis de 100 ml en diluyente Androstar Plus®. Posteriormente se realizó enfriamiento lento y progresivo hasta $17C^{\circ}$ durante 2 horas.

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

2 Tabla. Variables evaluadas, definición, técnica utilizada, unidades de medición y valores de referencia función y resistencia de membranas de los 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	Función de la membrana espermática	Espermatozoide funcional permite la entrada del agua a la célula por ósmosis en un ambiente hipoosmótico	Test de hinchazón y hipoosmótico (HOST, hypoosmotic swelling test)	Po ≥ 60 % Pérez-Llano et al. (2001)
	Espermatozoides funcionalmente competentes	Población de espermatozoides con integridad y funcionalidad de la membrana, con morfología normal, con el	Prueba combinada de viabilidad por PI, integridad del acrosoma	Porcentaje ≥ 25 % Valencia et al. (2009)

			acrosoma	con	FITC-			
			íntegro después	PNA,				
			de sufrir estrés	resistencia				
			hipoosmótico	de				
			(Resistencia	membrana				
			osmótica), que	por	estrés			
			potencialmente	hipoosmótico				
			fecunda	o				

Dependiente	Tasa de	no	No	Dete	Po	≥9
	retorno		detección	de	cción	5%
			celo después de	12	horas	
			18 a 22 días pos	entre	los días	
			inseminación de	18	a	22
			la cerda	después	de la	
				inseminación		
				con macho		
				recelador		

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.

Procedimiento – Protocolo

Método: Combinación De Shost, Marcaje Con Pi/Fitc-Pna Y Fijación Con Solución Formolada

Principio Y Descripción Del Método

Con este método se pueden distinguir y cuantificar fácilmente los EFC, 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. La exposición de los espermatozoides a condiciones hipoosmóticas en el sHOST 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. 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.

Desarrollo De Las Pruebas De Resistencia Y Funcionalidad Espermática: 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.

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.

Reactivos (Pureza, Concentración Y Preparación)

- 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 UCaldas FITC-PNA se agrega 4 µL de este por cada 20 µL de PBS).
- Segunda forma de preparación FITC-PNA: con el reactivo nuevo L7380 de sigma se agrega 1000 µL 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 µL de solución stock y 100 µL de PBS) para crear una solución de trabajo, volumen total 200 µL.

Preparación Y Preservación De Muestras

El material a analizado es una contramuestra de semen diluido refrigerado, preparado en cada granja y transportado 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, y enviadas al laboratorio inmediatamente después de procesadas.

Se debe resuspender el semen a 10^8 espermatozoides/mL en PBS a igual temperatura del semen.

Procedimiento

Preparación de la suspensión, incubación y fijación

- Homogenizar manualmente la muestra de semen invirtiendo suavemente el frasco y depositar 1,5 mL en un vial
- Depositar 1 mL de solución hipoosmótica, 10 μ L de la solución de trabajo FITC-PNA y 5 μ L de la solución stock de PI 2,4 mM en un segundo vial
- Disponer el vial con semen y el vial con la mezcla anterior, por separado, en un baño maría a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Encender el baño maría para subir progresivamente hasta $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 15 minutos.
- Después de subir hasta $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, transferir 500 μ L de semen, previamente homogenizado con dos pipeteos suaves, al segundo vial con la mezcla de reactivos, homogenizar con dos pipeteos suaves y dejar por 5 minutos a $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Adicionar 10 μ L de solución salina formolada a la mezcla del semen con los reactivos para fijar los espermatozoides.
- Homogenizar la mezcla anterior en vortex por 5 segundos, disponer 5 μ L en un portaobjetos de vidrio y colocar cubreobjetos.

Observación En El Microscopio

La observación inicio con 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.

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 (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 deposito 1,5 mL en un vial, 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 μL de semen al vial con la solución hipoosmótica, para dejar por 5 minutos a esta misma temperatura y seguidamente depositar 350 μL de esta mezcla al vial con la solución salina formolada. Luego se transfirieron 5 μL 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.

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 Silva & col (2006, como se citó en Suhevic, 2015). Tiene afinidad por la terminación α -D-glucosil y α -D-manosil residuales de glicoproteínas, y se une al azúcar α -manósido de la matriz acrosomal. Esto se visualiza como una fluorescencia verde-amarillenta (λ 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 (λ emisión=570 nm) de Arruda & col (2007, como se citó en Suhevic, 2015).

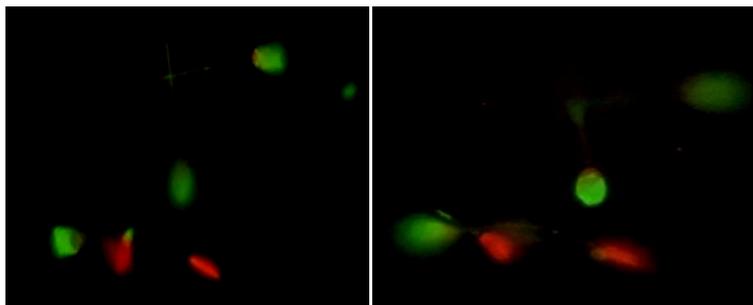


Ilustración Fotografía 1 y 2 espermatozoides porcinos con tinción de marcaje con PI y FITC-PNA, fuente propia. Laboratorio de biología de la reproducción animal. Universidad de Caldas 2022

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.

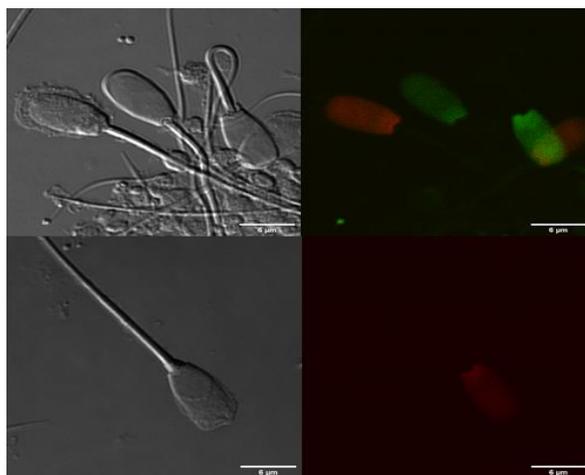


Ilustración Espermatozoides porcinos macro y con tinción y marcaje con PI y FITC-PNA, fuente propia laboratorio de reproducción animal. Universidad de Caldas 2022

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 3. 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 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 3 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.

Una vez procesadas las muestras se procedió al análisis de los resultados para su posterior presentación

Análisis E Interpretación

En esta fase se realizó como parte final del trabajo de investigación después de haber realizado toda la recolección de los datos, resumiendo las observaciones llevadas a cabo en el laboratorio, dando paso a la sistematización de toda la información.

ID MACHO	CONTEO 1	CONTEO 2	PORCENTAJE PREÑEZ	NUMERO DE HEMBRAS INSEMINADAS	TASA DE PARTOS (PROMEDIO LECHONES)
78	23%	20%	50%	2	7
79	11%	19%	50%	2	7.5
80	30%	14%	66.6%	3	7.6
81	24%	27%	100%	1	17
82	16%	17%	100%	1	10
772- 1 VERDE	16%	31%	100%	2	13
785- 1 ROJO	27%	21%	100%	2	12.5
69	55%	37%	100%	4	17.2
70	27%	40%	75%	4	9.5
72	42%	44%	91.6%	12	13.0
7801	42%	45%	50%	12	7.2

Tabla 4 *Porcentaje de preñez por cada verraco.*

ID VERRACO	ID HEMBRAS INSEMINADAS	LECHONES TOTALES	NACIDOS	CONTEO 1
78	CHCB8864	14		23%
78	CHCB9104	0		23%
79	CHCB9202	0		11%
79	CHCB9194	15		11%
80	CHCB9063	13		30%
80	CHCB5609	0		30%
80	CHCB9096	10		30%
81	CHCB9009	17		20%
82	CHCB9094	16		16%
772-1 VERDE	GPSI0010	12		16%
772-1 VERDE	GPSI0011	14		16%
785-1 ROJO	GPSI0014	10		27%
785-1 ROJO	GPSI0017	15		27%
69	2095	18		55%
69	2118	15		55%
69	1006	18		55%
69	9945	18		55%
70	1439	14		27%
70	1776	11		27%
70	1809	0		27%
70	1839	13		27%
72	441	17		42%
72	444	18		42%
72	434	5		42%
72	399	20		42%
72	451	16		42%
72	467	12		42%
72	473	16		42%

72	440	16	42%
72	448	13	42%
72	448@1	0	42%
72	476	9	42%
72	406	15	42%
7801	753	0	42%
7801	1073@1	0	42%
7801	1743	0	42%
7801	1769@1	0	42%
7801	1780	12	42%
7801	1783@1	0	42%
7801	9619	15	42%
7801	2194	18	42%
7801	2140	0	42%
7801	2192	13	42%
7801	2206	15	42%
7801	2209	14	42%

Tabla 5 *Lechones nacidos totales vivos por macho y cada hembra.*

ID VERRACO	PORCENTAJE DE PREÑEZ		ID CERDA	DIAS DE GESTACION	NUMERO LECHONES NACIDOS VIVOS
	CONTEO 1	CONTEO 2			
69	55%	37%	2095	114	18
			2118	117	15
			1006	115	18
			9945	114	18
70	27%	40%	1439	115	14
			1776	116	11
			1809	19	0
			1839	114	13
71	20%	38%	0	0	0
72	42%	44%	441	113	17
			444	116	18
			434	116	5
			399	116	20
			451	114	16
			467	117	12
			473	116	16
			440	115	16
			448	114	13
			448@1	22	0
			476	116	9
406	116	15			
74	36%	23%	0	0	0
77	22%	33%	0	0	0
7801	42%	45%	753	26	0
			1073@1	109	0
			1743	46	0
			1769@1	100	0

1780	117	12
1783@1	56	0
9619	114	15
2194	115	18
2140	124	0
2192	114	13
2206	115	15
2209	116	14

Tabla 6. *Días de gestación de las cerdas y el macho que las inseminó 19/05/2022.*

ID VERRACO	PORCENTAJE		ID CERDA	FECHA INSEMINACION	DIAS DE GESTACION	NUMERO DE LECHONES NACIDOS TOTALES
	CONTEO 1	CONTEO 2				
78	23%	20%	CHCB8864	6/04/2022	117	14
			CHCB9104	6/04/2022	102	0
79	11%	19%	CHCB9202	7/04/2022	REPITE CELO A LOS 21 DIAS	0
			CHCB9194	7/04/2022	114	15
80	30%	14%	CHCB9063	7/04/2022	114	13
			CHCB5609	8/04/2022	REPITE CELO A LOS 21 DIAS	0
			CHCB9096	8/04/2022	114	10
81	24%	27%	CHCB9009	9/04/2022	114	17
82	16%	17%	CHCB9094	9/04/2022	111	16
772-1 VERDE	16%	31%	GPSI0010	5/04/2022	114	12
			GPSI0011	6/04/2022	115	14
785-1 ROJO	27%	21%	GPSI0014	8/04/2022	114	10
			GPSI0017	8/04/2022	116	15

Tabla 7 Días de gestación de las cerdas y el macho que las inseminó 05/04/2022

DISCUSION

“La relación entre la motilidad y la fertilidad está sumida en una continua controversia (Pursel y cols., 1984; Strezezek y Skaweta, 1984; Aalbers y cols., 1985; Martínez y cols., 1986; Berger y Horton, 1988; Galli y Bosisio, 1988; Hammitt y Martin, 1989; Berger y Parker, 1989; Gerfen y cols., 1994; Waberski y cols., 1994a). Una posible causa de la discrepancia en los resultados se basa en que los estudios se realizan en condiciones experimentales con diferentes métodos de valoración de la motilidad, diferentes tratamientos de conservación del semen (fresco, diluido y congelado) y con diferencias en el número de espermatozoides en las dosis con las que se inseminan las reproductoras. Estas mismas diferencias en los resultados han sido obtenidas en el ganado vacuno donde la relación entre la motilidad y la fertilidad varía en los diferentes estudios entre un valor de r próximo a cero hasta valores de 0’6 (Graham y cols., 1980).” (GADEA, 1997) sin embargo dentro de esta investigación, como en la nuestra, no existe una correlación significativa. “En cuanto a la relación entre los constituyentes iónicos del plasma seminal y la fertilidad, no encontramos diferencias significativas para los distintos cationes analizados para los distintos grupos de fertilidad. Jeyendran y cols. (1989) ponen de manifiesto una baja correlación en la especie humana entre los constituyentes del plasma seminal y la fertilidad, con unos niveles de significación insuficientes como para servir de factor predictivo de la fecundación.” (Gadea, 1997).

En contraste, “El presente estudio se centra en la validez del HOST corto como complemento o incluso como alternativa al análisis de semen porcino de rutina. El sHOST es fácil de realizar, reproducible y objetivo. Además, a diferencia de las pruebas convencionales, presenta una correlación positiva moderada pero significativa con la tasa de parto. Esto puede deberse a su objetividad y también a que puede discriminar subpoblaciones de espermatozoides con membranas plasmáticas dañadas o no funcionales en muestras previamente seleccionadas

por su buena calidad seminal. Sin embargo, se necesitan más datos para confirmar esta relación. Finalmente, el sHOST parece ser más sensible que las pruebas que determinan la motilidad y el estado acrosomal al daño de la membrana plasmática causado por el choque frío.” (Garcia, 1995) quien encontró correlación dentro de estas pruebas. Valencia et al. (2019) si encontró correlación entre espermatozoides funcionalmente competentes y fecundación *In Vitro*: “Los dos métodos in vitro para evaluación de la calidad seminal de semen porcino, utilizados en el laboratorio de Biología de la Reproducción, son consistentes, no son afectados por el analista, son adecuado en relación de R&R, se establecieron condiciones de análisis en robustez y su incertidumbre es conocida; razón por la cual son conformes para su uso en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Caldas.”

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las correlaciones entre espermatozoides funcionalmente competentes y lechones nacidos totales no fueron significativas estadísticamente, esto dado que la cantidad de animales que se requerían en la prueba no fue posible conseguirlos.

La evaluación de espermatozoides se hace individualmente para motilidad espermática, morfología y supervivencia, en la prueba realizada dentro de esta investigación se cuenta con una técnica de laboratorio que evalúa varias cualidades de los espermatozoides a la vez, permitiendo la identificación de una población élite (Espermatozoides funcionalmente competentes) que es la que potencialmente fecunda.

Los espermatozoides funcionalmente competentes presentaron una tendencia de relación con el número de lechones nacidos totales, sin embargo, esta no fue significativa, por lo que se sugiere aumentar el tamaño de la muestra para corroborar resultados de la prueba.

Se recomienda que dentro de las granjas se haga mayor seguimiento de los machos reproductores y en investigación una ampliación de este estudio con mayor número de muestras.

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>
- Arango Betancur, Valeria. Evaluación De Parámetros Productivos Y Reproductivos En Granjas Porcícolas Para Socios De La Cooperativa COLANTA En El Norte De Antioquia. Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Programa de Zootecnia. Caldas-Antioquia. 2019.
- Censo Pecuario ICA 2021.
<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>.
- Cintra, M., García, L., Hernández, Y., & Pérez, M. (2006). Características reproductivas de la cerda. *Redvet*, VII(1), 1–36.
- Libermed Verlag , K. M. Dyce & W.O.Sack & C. J. G. Wensing. Anatomia veterinaria, (p.785 a 792). 1991.Editorial Medica Panamericana S.A, Marcelo T. de Avelar 2145- Buenos Aires.
- Del Valle Rodríguez, Alexei Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos utilizados en la monta natural. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 18, núm. 10, octubre, 2017, pp. 1-17 Veterinaria Organización Málaga, España.
- Díaz Franco, O., Mesa, Henry., Valencia Mejía, Juan Guillermo, Gómez Londoño, Ggerman., Henaó Uribe, Francisco Javier. Evaluación De La Integridad Acrosomal Y La

Funcionalidad Bioquímica De La Membrana Espermática En Cerdos Reproductores Con Gotas Citoplásmicas Persistentes: Vol. vol. XIX (Número Núm. 5). Universidad del Zulia Venezuela, septiembre-octubre 2009.

García, J. A. Evaluación práctica del semen porcino. Acontecer Porcino. Vol. 11. No. 32. 1995. pp. 34-42.

Gordon, I. Controlled Reproduction in Pigs. 1997. ISBN 0851991165. En Trolliet, J. C. 2005. Productividad numérica de la cerda, factores y componentes que la afectan. Facultad de Agronomía y Veterinaria Universidad Nacional de Río Cuarto. Internet. <http://www.produccionanimal.com.ar>.

J. Gadea. La Evaluación De La Capacidad Fecundante De Los Espermatozoides Porcinos Mediante La Fecundación In Vitro (Revisión). Dpto. de Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia, 2001.

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).

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 its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction and Fertility*, 70:219-228

Marín Raquel, Escobar Carlos, Mesa Henry, Gomez German, Henao Francisco Javier. Evaluación De Semen Diluido De Verraco Mediante Prueba De Endosmosis. Revista No. 107 Porcicultura Colombiana. ISSN: 0122-4220, Enero – Febrero 2007.

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*.

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>

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.

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>

Tejerina Ampudia, Fernando.. Valoración Mediante Imágenes Digitales Del Semen Descongelado De Verraco. Universidad De León, Facultad De Veterinaria Departamento De Medicina, Cirugía Y Anatomía Veterinaria. León, Diciembre De 2007.

Valverde, Antonio. Barquero, Vinicio. Carvajal, Vanesa. Biotecnología Aplicada Al Estudio De La Motilidad Del Semen Porcino. Biotecnología Aplicada Al Estudio De

La Movilidad Del Semen Porcino 1. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 32, núm. 2, págs. 662-680, 2021. Universidad de Costa Rica. 2021.

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>