

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



PORCENTAJE DE INTEGRIDAD ACROSOMAL Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA
EN SEMEN DE CERDO CON TIEMPOS ESPECÍFICOS DE PROCESAMIENTO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA: ITZCOATL ADRIÁN LÓPEZ NIÑO

ASESOR: MVZ ÓSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

I

- 1 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM por darme la oportunidad de formarme en sus aulas desde iniciación universitaria (que orgullo ser cachorro puma).

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ-UNAM por brindarme la mejor oportunidad para ser un profesionalista, en donde conocí buenos amigos, profesores y donde pude ampliar mi visión de la vida.

A todos los animales que formaron parte importante y fundamental de mi conocimiento teórico y práctico, GRACIAS.

Al Dr. Óscar Gutiérrez Pérez por todo el apoyo brindado en mi formación como alumno, como servicio social y como tesista, ¡gracias doc!, lo aprecio.

A mis sinodales que me guiaron y aconsejaron para terminar este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres amados que me dieron las herramientas necesarias para guiarme en esta vida, a ellos que me dan el mejor consejo cuando lo necesito, a ellos quien me han apoyado incondicionalmente en cada decisión que he tomado y me han llenado de dicha y amor, a ellos principalmente les dedico estas palabras.

A mi papá, a ti don Francisco por ser mi mayor ejemplo de vida, de superación y de constancia, gracias por enseñarme a nunca rendirme, por enseñarme la importancia del trabajo, por apoyarme y guiarme en todo momento, soy afortunado de tenerte como padre, eres símbolo de honestidad, firmeza, lealtad, responsabilidad y compromiso, te amo.

A mi mamita chula que siempre me guía con su buen consejo y sabiduría, me cobija y me motiva a ser cada vez mejor persona, eres el mejor ejemplo de la palabra éxito y libertad. Gracias por ser una madre amorosa, comprensiva, justa, valiente y comprometida, gracias por enseñarme el valor de la vida, por alentarme a no ser conformista y por enseñarme a ser libre e independiente, te amo.

A mis hermanas que siempre me cuidan y me apoyan pero no me solapan, gracias por compartir la vida conmigo, son mi mayor tesoro. A ellas que también son mi ejemplo, mi motivación y mis maestras.

A Janicua por hacerme ver mis errores y aconsejarme, eres muy exitosa, admiro tu firmeza, dedicación y esfuerzo.

A Iyari que siempre nos saca sonrisas con su sentido del humor, gracias por escucharme y aconsejarme, eres ejemplo de valentía, admiro y aplaudo el apoyo que les brindas a las personas. Sé que serás una excelente madre.

CONTENIDO

Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
2. Antecedentes.....	11
2.1 La inseminación artificial.....	11
2.2 El semen.....	12
2.2.1 Los espermatozoides.....	13
2.3 Técnica de inseminación artificial en cerdos.....	15
2.3.1 Colecta de semen.....	15
2.3.2 Evaluación seminal o seminograma.....	17
2.3.3 Preparación de dosis seminales.....	22
2.3.4 Diluyente.....	23
2.3.4.1 Funciones del diluyente.....	23
2.3.4.2 Aporte de nutrientes.....	24
2.3.4.3 Estabilizador de la membrana.....	24
2.3.4.4 Regulación del pH.....	24
2.3.4.5 Control de la presión osmótica.....	25
2.3.4.6 Inhibición del crecimiento bacteriano.....	25
2.3.4.7 Tipos de diluyentes.....	26
3. Justificación.....	26

4. Hipótesis.....	26
5. Objetivo general.....	27
6. Objetivos específicos.....	27
7. Material y métodos.....	28
7.1 Localización.....	28
7.2 Materiales.....	28
7.2.1 Recursos humanos.....	28
7.2.2 Del laboratorio.....	28
7.2.3 Biológicos.....	29
7.3 Métodos.....	30
7.3.1 Obtención del semen.....	31
7.3.2 Pasos para la colecta.....	32
7.3.3 Preparación del diluyente.....	33
7.3.4 Evaluación del semen.....	33
7.3.5 Tinción azul brillante de coomassie (pre y post dilución).....	34
7.3.6 Tinción eosina-nigrosina (pre y post dilución).....	35
8. Resultados.....	36

8.1	Efecto del tiempo sobre integridad acrosomal en semen fresco y semen diluido mantenido a temperatura constante.....	37
8.2	Efecto del tiempo sobre la membrana espermática en semen crudo y semen diluido mantenido a temperatura constante.....	38
8.3	Efecto del tiempo sobre la presencia de anomalías en semen crudo y semen diluido mantenido a temperatura constante.....	39
8.4	Análisis de posible efecto de variabilidad en las muestras atribuidas al semental sobre la integridad acrosomal.....	40
8.5	Análisis de posible efecto de variabilidad en las muestras atribuidas al semental sobre la morfología espermática.....	41
9.	Discusion.....	43
9.1	Integridad acrosomal.....	43
9.2	Viabilidad.....	44
9.3	Morfología.....	45
9.4	Efecto macho.....	47

10.	Conclusiones.....	48
11.	Sugerencias.....	49
12.	Referencias.....	50

RESUMEN

LÓPEZ NIÑO ITZCOATL ADRIAN. Porcentaje de integridad acrosomal y viabilidad espermática en semen de cerdo con tiempos específicos de procesamiento (bajo la dirección de: MVZ, Óscar Gutiérrez Pérez).

La elaboración de dosis seminales de calidad requiere de eventos de proceso bien establecidos con puntos críticos como el control de la temperatura, la formulación del diluyente y la forma de dilución. Con respecto al tiempo que transcurre entre colecta y dilución hay pocas referencias que describan el daño morfofuncional de la célula. El presente estudio evaluó la viabilidad e integridad acrosomal en procesos con diferentes tiempos entre colección dilución (0,15,30 y 60 min) y alteraciones a diferentes días de conservación (1,3,5 días), utilizando tinciones de viabilidad (eosina-nigrosina) e integridad (azul de coomassie). La integridad acrosomal y la viabilidad espermática no presentaron cambios a diferente tiempo de procesamiento, ni con diferentes días de almacenamiento por lo que se concluye que el tiempo entre la colección y la dilución puede ser hasta de 60 min sin efectos adversos sobre la célula. Se recomienda la implementación de un monitoreo de los eyaculados individuales de los verracos durante su almacenamiento, ya que existen variaciones individuales en cada semental (efecto macho), con lo que es factible sugerir la capacidad de cada semental para largos o cortos periodos de almacenamiento.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la inseminación artificial (IA) forma parte integral de la rutina de trabajo reproductivo en todo tipo de explotación porcina. Su uso se ha masificado, tanto que, a nivel mundial, se utiliza casi en la totalidad de las cerdas que se encuentran en granjas de producción porcina intensiva (Julca, 2014).

El manejo rutinario en este proceso, consiste en la evaluación de la calidad seminal, preparación de las dosis seminales y su conservación. Para tener éxito y conocer las oportunidades de mejora que los procedimientos ofrecen, se requiere analizar cada uno de los mismos y establecer los factores que podrían estarlos afectando (KUBUS 2010).

El éxito de la fecundación mediante IA requiere de la producción de dosis seminales de calidad, por lo que es preciso tener conocimiento de todos los procesos que intervienen en la extracción de semen de verracos seleccionados para este fin (Trujillo Ortega, et al 2017); en la práctica de la porcicultura, la conservación de semen refrigerado a 16°C es efectiva, pues con el uso de este semen logra una fertilidad al parto mayor a 85%, pero con la limitante de que la célula espermática solo se conserva viable de 3 a 5 días (Gadea, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 La inseminación artificial.

La inseminación artificial (IA) consiste en la aplicación de dosis seminales en el aparato reproductivo de la hembra, con el fin de obtener la mayor tasa de fecundación. Dicha inseminación puede ser cervical, post cervical o intrauterina profunda; en la tradicional la dosis se deposita en los primeros centímetros del cérvix, mientras que en la post cervical y la intrauterina profunda se deposita en el útero atravesando el cérvix mediante el uso de una sonda complementaria a la tradicional que deposita los espermatozoides en el cuerpo del útero (post cervical) o en el comienzo del cuerno uterino (intrauterina profunda) (Roche, 2014).

En cerdos la IA, tomó auge debido a la explotación porcina en diferentes países, y a la tendencia a la tecnificación, necesidad de mayor número de cerdas en gestación y las necesidades del mercado de carne y de animales de reemplazo (Prera, 2002).

La IA porcina fue iniciada por Ivanov en Rusia en los primeros años del siglo XX, posteriormente se desarrolló su uso y en los años siguientes se fue extendiendo a otros países, sin embargo el verdadero desarrollo y la amplia aplicación a nivel comercial de la IA porcina se produce a partir de la década de los 80, cuando se estandarizan los protocolos de inseminación (Becerril, 2004).

En la actualidad, la inseminación artificial porcina es una técnica reproductiva de amplia diseminación en todo el mundo, aunque el grado de utilización en los diversos países es muy variable (Gadea, 2007).

2.2 El semen

En la reproducción porcina el macho posee un papel destacado ya que es el responsable no solo del mejoramiento genético, si no en gran medida de la fertilidad de la piara, ya sea en monta natural o inseminación artificial (Villa et al.,2008). En ambos casos, la calidad del semen juega un papel muy importante para lograr la fecundación.

En el caso de la IA, la obtención y el mantenimiento del semen son cruciales. En particular, para el mantenimiento del semen se utilizan los llamados diluyentes de inseminación artificial. Desde su uso, los diluyentes tienen como objetivo; aumentar el volumen de eyaculado (Landsverk, 2000), aportar nutrientes para mantener el metabolismo celular del espermatozoide, estabilizar la membrana celular, controlar el pH del medio, controlar la presión osmótica e inhibir el crecimiento bacteriano (Maqueda, 2006).

El semen es la suspensión celular líquida que contiene a los espermatozoides y a las secreciones procedentes de las glándulas sexuales accesorias (plasma seminal), el cual consta de 3 fracciones: 1) la pre-espermática, la cual es traslúcida; 2) la fracción rica en espermatozoides de color blanquecina y opaca, con consistencia espesa y 3) la post-espermática, con apariencia traslúcida, pero con mayor concentración de espermatozoides que la fracción pre-espermática (Hafez y Hafez, 2002).

La fracción rica en espermatozoides es la que se obtiene para ser utilizada en los procesos biotecnológicos como la inseminación artificial, fertilización in vitro o

criopreservación, para lo cual, en el caso de los cerdos, debe cumplir con ciertas características que son: volumen de 150-200 mL, concentración espermática de 200-300 millones/mL, pH de 7.3 a 7.8, motilidad del 80% y del 80-90% de espermatozoides morfológicamente normales (Hafez y Hafez, 2002).

2.2.1 Los espermatozoides

Los espermatozoides son células con una morfología altamente dinámica (Trujillo Ortega, et al 2017). Se les considera espermatozoides maduros cuando presentan anatomía alargada formada por una cabeza aplanada (portadora del núcleo) y una cola que contiene el aparato necesario, para la motilidad celular. Además el espermatozoide cuenta un acrosoma que es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza (Hafez y Hafez, 2002).

Los espermatozoides recién liberados del testículo son inmóviles e incapaces de unirse a la cubierta extracelular del ovocito (zona pelúcida); de hecho, los espermatozoides liberados de los túbulos seminíferos son infértiles, pero una vez transportados de la rete testis por los ductos deferentes al epidídimo sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que le confieren su potencial fecundante (Trujillo Ortega, et al 2017). Esta maduración incluye cambios funcionales que incluyen el desarrollo de la motilidad, así como la pérdida de la gota citoplasmática (Hafez y Hafez, 2002).

En el verraco, el tiempo que tardan los espermatozoides para recorrer el trayecto de la cabeza a la cauda del epidídimo es de 15 días (Trujillo Ortega, et al 2017), a

esta etapa se le conoce como maduración. La capacitación es un proceso que conlleva una cascada de reacciones (salida de colesterol, fosforilación de proteínas, incremento intracelular de ion Ca^{2+}) que llevan a una desestabilización y reorganización de los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que terminará con la exocitosis del acrosoma cuando el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida, este proceso es reversible, puede ser frenado mediante el contacto de los espermatozoides con sustancias estabilizadoras de la membrana plasmática (Flesch y Gadella, 2002).

Tras la eyaculación, los espermatozoides se encuentran inmersos en un líquido llamado plasma seminal. El plasma seminal es producido por una mezcla de secreciones procedentes del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias. Se caracteriza por una mezcla diversa de compuestos entre los que se encuentran: agua, lípidos, ácidos grasos, inmunoglobulinas, sustancias hormonales, iones inorgánicos, azúcares, sales orgánicas, enzimas y proteínas, las cuales sirven como tampón, mantienen la osmolaridad adecuada y un pH cercano a 7, además, de proporcionar fuentes de energía para su metabolismo (Johnson et al., 2000; Hafez y Hafez, 2002).

2.3 Técnica de inseminación artificial en cerdos:

En cerdos la IA es relativamente sencilla comparada con otras especies. En términos generales el proceso de IA se puede resumir en las siguientes fases (Oliva, Trejo 2004):

- Colecta de semen.
- Evaluación de la calidad espermática.
- Preparación de las dosis seminales.
- Inseminación de la hembra.

2.3.1 Colecta de semen:

El éxito de la colecta de semen y la calidad del eyaculado está influenciado por varios factores, entre los que se encuentran: la preparación del material antes de entrar a la sala de colecta, la preparación del verraco y la técnica utilizada para obtener la muestra. La muestra se obtiene de un animal entrenado para esta función (Oliva, Trejo 2004), el principal requisito durante la eyaculación del verraco es la presión que ejerce el cuello uterino de la cerda sobre la zona espiral del pene. Esto puede ser fácilmente simulado por presión manual (Camacho y Morejon, 2000) mediante la técnica de mano enguantada (Trujillo Ortega, et al 2017).

El material a utilizar durante todo este proceso debe estar estéril y a una temperatura de 37°C. La sala destinada a la extracción de semen debe estar limpia antes de que entre el verraco. En la sala de extracción se encuentra el potro o maniquí, en posición fija para facilitar el proceso. Antes de empezar la

extracción, se debe limpiar en seco toda el área alrededor del pene y prepucio. Una vez que el verraco monta el potro, se debe sostener firmemente el pene extrayéndolo en toda su longitud. El termo de colecta además de estar a 37°C, deberá tener un filtro o gasa para evitar la contaminación de la muestra. Quien colecta el eyaculado, deberá identificar las tres fracciones características del semen: pre-espermática, espermática y post-espermática.

- a. Fracción preespermática: está constituida por las secreciones de la próstata, vesículas seminales y algunos grumos procedentes de las glándulas de cōwper. Estos grumos de textura gelatinosa reciben comúnmente el nombre de “tapioca” y cumplen la función de tapón del cuello del uterino impidiendo el retroceso. La fracción es prácticamente transparente sin espermatozoides y con un volumen de 10-35 mL (Córdova y Muñoz, 2010).
- b. Fracción espermática o rica en espermatozoides: ésta se diferencia de la primera por presentar un color blanco lechoso. Su contenido es principalmente espermatozoides y secreciones de la vesícula seminal y próstata (Veliz y Gonzáles, 2003). Su volumen oscila entre 50-150 mL es variable dependiendo de los factores que influyan en la producción espermática; raza, edad, nutrición, ritmo, método de colecta, etc (Córdova y Muñoz, 2003).
- c. Fracción post espermática: es pobre en espermatozoides y está constituida por las secreciones de las glándulas accesorias (Trujillo Ortega, et al 2017),

es de color blanquecino transparente, con tapioca a lo largo de su emisión con volumen aproximado de 200-300mL (Córdova y Muñoz, 2010).

2.3.2 Evaluación seminal o seminograma:

La evaluación seminal o seminograma es el estudio macro y microscópico de una muestra de semen, para determinar su calidad, previo a su procesamiento (Trujillo Ortega, et al 2017).

Evaluación macroscópica:

- **Temperatura:** la temperatura debe medirse y registrarse al recibir el termo colector, usualmente debe encontrarse entre 35 y 37°C. El semen se debe de mantener en baño maría durante toda la evaluación, la cual no debe exceder los 15 minutos. Cualquier fluctuación en la temperatura del semen, reduce la viabilidad del esperma, 2 a 3 °C por debajo o arriba de la temperatura pueden reducir hasta un día de viabilidad (Maqueda, 2006 y Minitube, 2003).

De igual manera el material que entre en contacto con el semen y que está destinado a mantener vivos a los espermatozoides para la evaluación debe de estar a la misma temperatura (Maqueda, 2006).

- **Volumen:** según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco el volumen oscila entre 150 a 500mL.

Es recomendable colocar una toalla sobre la plataforma de la balanza antes de su uso, para evitar que los espermatozoides sufran un choque frío. Después de tarar la balanza, se coloca la bolsa de semen, se hace la lectura y se convierten los gramos en mililitros (1g=1ml), para este propósito se debe restar el peso del recipiente (bolsa) que contiene al eyaculado. Anotar la información en el registro de producción individual (Trujillo Ortega, et al 2017).

- Color: es variable conforme a la concentración espermática y se tienen las siguientes categorías: blanco transparente, blanco lechoso y blanco cremoso (Trujillo Ortega, et al 2017). El semen se desechará si presenta sangre o un tono similar (Córdova y Muñoz, 2010), los tonos verdosos o metálicos reflejan tapioca oxidada y los tonos amarillos son sugerentes de contaminación por orina (Trujillo Ortega, et al 2017).
- Olor: el olor del semen del verraco es *sui generis* y se caracteriza por estar afectado ligeramente por las feromonas del aparato genital (Camacho y Morejon, 2000). El semen debe de ser inodoro, cualquier olor significa que ha sido contaminado con sangre, pus o líquido prepucial (Trujillo Ortega, et al 2017).
- pH: puede variar su valor por manipulación, tiempo, contaminación bacteriológica, concentración, etc. Debe medirse inmediatamente obtenido el semen (Camacho y Morejon 2000), uno de los métodos utilizados son las tiras reactivas, solo se coloca una gota de semen sobre los cuadros de colores, esperar 5 segundos y comparar el color con la escala establecida

por el fabricante (Trujillo Ortega, et al 2017). Para un eyaculado recién obtenido se admiten valores de 6.4-7.4 (Camacho y Morejon, 2000).

Evaluación microscópica:

- **Motilidad:** la estimación de la motilidad es una de las pruebas más importantes dentro de la evaluación espermática, por tener un impacto en la fertilidad de la dosis seminal (PIC, 2003). Se evalúa el movimiento progresivo de los espermatozoides; la evaluación de la motilidad consiste en: aplicar una gota pequeña de semen en el portaobjetos, colocarle un cubreobjetos y observar la muestra con un objetivo 10x. El porcentaje de motilidad se calcula contando 100 espermatozoides con el objetivo de 40x y se registran los que están en movimiento y los que no. Por ejemplo, 85 espermatozoides moviéndose de un total de 100; el porcentaje es de 85%. La evaluación individual se hace a partir de la misma gota cambiando de 10x a 40x y se clasifica del 0 al 5 y el movimiento individual se denomina “vigor” (Trujillo Ortega, et al 2017):
 - 0: espermatozoides inmóviles o muertos.
 - 1: espermatozoides sin desplazamiento, girando sobre sí mismos.
 - 2: espermatozoides con movimientos anormales y eventualmente.
 - 3: espermatozoides con desplazamientos progresivos lentos y sinuosos.
 - 4: espermatozoides con desplazamientos progresivos rápidos.
 - 5: espermatozoides con desplazamientos progresivos muy rápidos.

Calificación con 2 o menos no deberán utilizarse para inseminación.

- Aglutinación: se define como la unión directa entre espermatozoides por una alteración de sus membranas y se clasifica como sigue (Trujillo Ortega, et al 2017):
 - No se observa aglutinación.
 - Aglutinación baja (+)
 - Aglutinación moderada (++)
 - Aglutinación severa (+++)
- Agregación: consiste en la unión de los espermatozoides a detritos, basura o leucocitos, se clasifica como agregación baja, moderada o severa (Trujillo Ortega, et al 2017).
- Concentración: es la determinación del número de espermatozoides por unidad de volumen en el eyaculado (Córdoba y Muñoz, 2010). El cálculo de la concentración espermática se logra usando diferentes métodos como son: el espectrofotómetro, colorímetro, las cámaras de Neubauer, Thoma y Bürker (Trujillo Ortega, et al 2017).
- Anormalidades: se dividen según su origen en primarias, secundarias y terciarias. La presencia de espermatozoides anormales se conoce como teratozoospermia, el porcentaje de anormalidades aceptado es de 25% (Trujillo Ortega, et al 2017).
 - Primarias: defectos en la espermatogénesis.
 - Secundarias: producidas durante el paso por el epidídimo.
 - Terciarias: manejo inadecuado de la muestra (Singleton, 2001).

- Vitalidad y viabilidad (células vivas y muertas): la pérdida de continuidad de la membrana plasmática se asocia con la pérdida de viabilidad celular. Sin embargo, una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. Se pueden utilizar diferentes técnicas de tinción para identificar espermatozoides vivos y muertos, como la de tripán azul. Con esta tinción el espermatozoide vivo se observa blanco y el muerto azul; con la tinción eosina-nigrosina, el espermatozoide vivo se ve blanco y el muerto rojizo (Trujillo Ortega, et al 2017).

Diversos factores afectan la viabilidad de los espermatozoides de cerdo antes, durante o después del proceso de conservación, los cuales es necesario tomar consideración para minimizar la variabilidad en los porcentajes de viabilidad de las células espermáticas al ser procesadas. Estos factores han sido relacionados a las condiciones del cerdo (la edad y la raza), al manejo del semen (intervalo entre la recolección, temperatura y condiciones bajo la cual se recolecta el eyaculado), a la calidad del eyaculado (motilidad, concentración y morfología normal del espermatozoide), a las condiciones de transporte, así como a la composición de los diluyentes.

- Estado del acrosoma: el acrosoma es la estructura situada en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide (Trujillo Ortega, et al 2017), es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza (Hafez y Hafez, 2002) tiene un papel crucial en la fecundación al momento de penetrar el ovocito, lo cual sucede debido a cambios fisiológicos en el acrosoma (capacitación espermática) (Trujillo

Ortega, et al 2017). La capacitación es un proceso que conlleva una cascada de reacciones (salida de colesterol, fosforilación de proteínas, incremento intracelular de ion Ca^{2+}) que llevan a una desestabilización y reorganización de los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que terminará con la exocitosis del acrosoma cuando el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida, este proceso es reversible, puede ser frenado mediante el contacto de los espermatozoides con sustancias estabilizadoras de la membrana plasmática (Flesch y Gadella, 2000).

Existen diferentes tinciones para evaluar el estado del acrosoma y que básicamente permiten revisar su integridad: Kovacs y Foote, eosina-verde rápido, así como azul de coomasie (Trujillo Ortega, et al 2017).

2.3.3 Preparación de dosis seminales:

Una vez que se evaluó la calidad del semen, se puede proceder a preparación de las dosis seminales para la inseminación artificial. El número y la calidad de espermatozoides inseminados determinan el impacto del verraco sobre el tamaño de la camada (Flowers, 2002). La preparación de las dosis seminales consiste en dividir el volumen total del eyaculado, previamente analizado y preparar las dosis que contendrán una concentración de espermatozoides viables que garanticen la fecundación (Trujillo Ortega, et al 2017).

El semen se conserva con el objeto de aprovechar al máximo los espermatozoides contenidos en el eyaculado de un verraco; por esta razón el semen se debe conservar a una temperatura de 15-17°C, siendo necesario el uso de los diluyentes si se quiere prolongar la viabilidad espermática (Vetefarm, 2011).

Otro factor importante en la conservación de la calidad del semen es la temperatura, la reducción de la temperatura debe de hacerse en dos o tres horas hasta que el semen alcance la temperatura ideal para su conservación (15-17°C). La disminución de la temperatura induce una disminución del metabolismo y de la motilidad espermática. También contribuye a frenar el crecimiento bacteriano (Aleman et al., 2007)

2.3.4 Diluyente:

Es la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias (Maqueda, 2006), preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel adecuado de fertilidad en el semen (Fuentes et al., 2005).

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto genital de la hembra (Lecoz, 2005). En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un periodo de tiempo muy limitado. Para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario reducir la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la extensión en un medio adecuado y reducción de la temperatura (Gadea, 2003).

2.3.4.1 Funciones del diluyente: para llevar a cabo su función, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática, la protección frente al shock térmico, control del pH del medio, la

presión osmótica, estabilizar la membrana, la inhibición del desarrollo microbiano y aumentar el volumen del semen (Gadea, 2007).

2.3.4.2 Aporte de nutrientes: el espermatozoide tiene capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar el movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más frecuentemente utilizada en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque otras fuentes como galactosa, fructosa, ribosa y trealosa han sido utilizadas sin tener muchas ventajas sobre la glucosa (Maqueda, 2006).

2.3.4.3 Estabilizador de la membrana: algunas sustancias en el extensor se adicionan con el fin de reducir o retardar alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas de los espermatozoides (Gadea, 2003). Las principales sustancias utilizadas son seroalbumina bovina (BSA), hidroxitolueno butilado (BTH), etilén disódico diamino tetracetato (EDTA), polivinil pirrolidona (PVP-40) y alcohol poli vinílico (Maqueda, 2001).

2.3.4.4 Regulación del pH: el pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a 7.4 ± 0.2 , al igual que otros fluidos orgánicos, y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del espermatozoide y su motilidad (Maqueda, 2006). El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide (carbohidrato principal es glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal

metabolito de este proceso, por lo que las sustancias buffer son necesarias en la preservación del semen ayudando a controlar el pH (Maqueda, 2006).

La adición de agentes tamponadores ayudan, por tanto, a controlar el pH del medio. Entre los tamponadores más simples se encuentran el bicarbonato y el citrato sódico, que presentan una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros tamponadores más complejos como el ácido 3N-Morfolino propanesulfónico (MOPS) o el ácido N-2-hidroxietil piperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (Lecoz, 2005).

2.3.4.5 Control de la presión osmótica: el espermatozoide porcino presenta una presión osmótica de 290-300 mOsm. Ni la motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm, mientras que cuando se reduce por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad. Los diluyentes isotónicos (300 mOsm) o ligeramente hipertónicos son los que mejores resultados han dado en condiciones de utilización comercial. Para regular la presión osmótica se utiliza principalmente sales de iones inorgánicos como el cloruro sódico y potásico (Cidosa, 2014).

2.3.4.6 Inhibición del crecimiento bacteriano: en la mayoría de los casos el tejido testicular y las glándulas accesorias del verraco están libres de bacterias y por tanto la contaminación bacteriana del eyaculado se produce durante el proceso de la colecta seminal. Para controlar el crecimiento microbiano en el diluyente es necesario añadir un agente antibiótico, ya que los componentes del diluyente (glucosa) así como la temperatura a las que se conservan las dosis (15-

16°C), permiten el crecimiento de la mayoría de bacterias gram negativas entre las que se incluyen (*E. Coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas*) (Gadea, 2007).

2.3.4.7 Tipos de diluyentes: en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación a corto plazo (menos de uno-tres días), o aquellos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de cuatro días hasta los 10 días), para mantener un semen en refrigeración y también existen para los de congelación (Agrovit, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

La inseminación artificial en cerdos se realiza con semen fresco refrigerado (16°C) debido a que el congelado aun presenta limitaciones en su conservación, por lo que evaluar los efectos en el tiempo que transcurre entre colecta-dilución y entre dilución-conservación daría una oportunidad a los productores de optimizar el recurso genético utilizado en la inseminación al disminuir los riesgos en el daño de la integridad acrosomal, vitalidad espermática y de pérdida de fertilidad del semen durante el procesamiento de la dosis.

4. Hipótesis

Los porcentajes de integridad acrosomal y viabilidad espermática en muestras monitoreadas a diferentes tiempos durante la elaboración de dosis de semen de

cerdo almacenado a 16°C, no presentarán cambios significativos a diferentes tiempos específicos de procesamiento.

5. OBJETIVO GENERAL

Valorar la integridad acrosomal y la viabilidad espermática por el tiempo transcurrido durante el procesamiento de elaboración de las dosis y si esto tiene alguna consecuencia sobre los mismos parámetros en semen de cerdo fresco/refrigerado a diferentes días de almacenaje.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Valorar los porcentajes de viabilidad espermática presentes en semen fresco y diluido a diferentes tiempos después de la colección 0, 15, 30 y 60 minutos.
2. Contabilizar los porcentajes de integridad acrosomal en semen fresco y diluido a diferentes tiempos después de la colección 0, 15, 30 y 60 minutos.
3. Correlacionar el efecto de los tiempos de procesamiento con los porcentajes de viabilidad e integridad acrosomal de semen procesado y su relación con el tiempo transcurrido después de la colección al día 1, 3 y 5.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Localización: el trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de análisis y procesamiento de semen porcino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Porcina (CEIEPP) de la FMVZ-UNAM, ubicado en el km 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, Estado de México.

7.2 Materiales.

7.2.1 Recursos humanos:

- Estudiante investigador.
- Médico Veterinario Zootecnista asesor.
- Auxiliar agropecuario de la posta de sementales del CEIEPP.

7.2.2 Del laboratorio:

- Baño María (37°C).
- Platina térmica (37°C).
- Termómetro de mercurio.
- Horno (37°C).
- Agua bidestilada.
- Diluyente comercial para semen (larga duración).
- Filtros para termo colector.
- Cubre y porta objetos.
- Tiras indicadoras de pH (0-7).
- Cámara de Neubauer.
- Pipetas descartables.

- Toalla de papel desechable.
- Tubos flexibles de 1A mL.
- Tinción Azul de Coomassie.
- Tinción Eosina-Nigrosina.
- Microscopio electrónico.
- Envasadora y selladora de dosis seminales.
- Vasos de precipitado 50 y 250 mL.
- Balanza.

7.2.3 Biológicos:

- Se utilizaron cinco sementales híbridos de línea terminal y de fertilidad comprobada de una edad entre dos y cuatro años, y se hizo la evaluación de ocho colectas de cada uno de los sementales. Cada uno se colectó una vez por semana, por lo cual se obtuvieron cinco colectas semanales.

7.3 METODOS

Los criterios de inclusión para los eyaculados del proyecto estuvieron determinados por la evaluación realizada en el seminograma. Estos valores fueron: motilidades mayores a 85% y morfoanomalias presentes menores al 15%.

Los eyaculados que no reunieron cualquiera de estas características fueron desechados y por tanto no incluidos en el proyecto.

Para valorar los efectos del tiempo entre colecta dilución sobre la integridad y viabilidad espermática, se tomaron alícuotas del eyaculado sin diluir en cuatro tiempos progresivos a los 0, 15, 30 y 60 minutos post colección.

En cada una de las alícuotas tomadas se corrió una prueba de vitalidad mediante la técnica de frotis secado al aire y teñido con la tinción vital de eosina-nigrosina. La tinción vital mencionada brindó información sobre el daño de la membrana plasmática, sin embargo esta información no siempre está relacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide.

Por lo anterior la integridad celular permitió realizar una estimación de la capacidad fertilizante por medio de la tinción de Coomassie, donde valoramos el potencial fecundante de la célula espermática mediante el daño al acrosoma, esta tinción permitió hacerlo de manera práctica al teñirse intensamente de azul brillante, el acrosoma permitió determinar fácilmente el estado de integridad que este presentaba.

Ambas técnicas se corrieron en semen fresco para tener la referencia anterior al tratamiento y se valoraron un mínimo de 200 células por tinción. Los eyaculados en fresco con viabilidades menores a 75% y/o daño acrosomal mayor al 40% fueron excluidos del experimento.

Posteriormente ambas tinciones se realizaron a partir de alícuotas tomadas de semen diluido (diluyente comercial de larga duración “Androstar®”) a los 0,15, 30 y 60 minutos post colecta y de semen sin diluir a los mismos periodos de tiempo, para comparar diferencias de integridad y viabilidad entre ambos grupos.

Para correlacionar el efecto del periodo de almacenaje y el tiempo de procesamiento, las tinciones de viabilidad e integridad mencionadas se realizaron a 1, 3 y 5 días post dilución.

Los resultados fueron analizados mediante una prueba ANOVA y una T pareada. La asociación entre variables no se determinó mediante un coeficiente de correlación debido a que no hubo efecto. La correlación se hubiera determinado entre tiempo y efecto. Todas las pruebas fueron realizadas mediante el programa estadístico minitab.

7.3.1 Obtención del semen:

La colección de semen porcino se realizó con la técnica de mano enguantada (Trujillo Ortega, et al 2017) con intervalos de una semana entre colecta, el material fue lavado con agua bidestilada, secado con toallas de papel y atemperado en horno (37°C) previo a la colecta.

7.3.2 Pasos para la colecta:

Preparación del semental: el propósito de preparar al semental es disminuir los riesgos de contaminación del semen durante el proceso de colecta y supervisar la condición física de los animales.

La higiene del semental consistió en hacer limpieza de la región ventral (en el abdomen) y prepucio (exprimir el divertículo prepucial) con toallas desechables y húmedas antes de ingresar al área de colecta.

Proceso de colecta: se obtuvo los eyaculados mediante la técnica de mano enguantada. Previo a esto se preparaba el termo colector colocando una bolsa de plástico especial, lleva un filtro en la superficie para la tapioca. El termo se encontraba atemperado a 37°. Se preparaban guantes nuevos de nitrilo para cada colecta colocándolos en la zona de transferencia del laboratorio a la posta. Esta zona se encuentra atemperada mediante una bombilla de 60 watts y tiene puertas corredizas de cristal para disminuir la contaminación cruzada entre posta y laboratorio.

Una vez que el semental se encontraba instalado sobre el potro, se exteriorizaba el pene y se hacía presión con la mano sobre el glande hasta lograr su erección total, esta presión se mantuvo hasta que el macho terminó de eyacular, esto es cuando el pene del semental queda flácido, se soltaba y se daba por concluida la colecta (Trujillo Ortega, et al 2017).

7.3.3 Preparación del diluyente:

Dos horas antes de la colecta de semen se preparaba el primer extensor y se atemperaba a 37°C.

7.3.4 Evaluación del semen:

Luego de la colección del semen, se llevaba al laboratorio, donde inmediatamente se ponía la bolsa en baño maría (37°C) para mantener su temperatura.

- Evaluación macroscópica:
 - o Volumen: el volumen se obtuvo pesando la bolsa en una báscula, se obtuvo el peso y se restaban 13g, que era el peso de la bolsa.
 - o Color: se asignó el color mediante la siguiente escala: blanco transparente, blanco lechoso y blanco cremoso.
 - o pH: se midió colocando una gota de semen en la tira de pH y se comparaba con la escala colorimétrica incluida por el fabricante.
 - o Olor: este se clasificaba al oler el filtro usado para la colecta.
 - o Temperatura: antes de pasar la bolsa colectora al baño maría se medía la temperatura con un termómetro de mercurio.

- Evaluación microscópica:
 - o Motilidad: la motilidad se evaluó colocando una gota de semen en el portaobjetos, en seguida se colocaba un cubreobjetos y se observaba en el microscopio en un objetivo de 40x. se contaban 100 espermatozoides y se registraban los que estaban en movimiento.

- Aglutinación
 - Agregación.
 - Concentración: se obtuvo con la cámara de Neubauer.
 - Anormalidades: se obtuvo con la cámara de Neubauer.
 - Vigor: con la misma muestra para evaluar motilidad se evaluó el movimiento individual clasificándolo en una escala del uno al cinco.
- estas dos evaluaciones se realizaban con la muestra para asignar motilidad y vigor.

7.3.5 Tinción azul brillante de Coomassie (pre y post dilución):

La evaluación de la integridad acrosomal se realizó por medio de la tinción Azul de Coomassie. Se colocaron 4 µl de muestra en un portaobjetos y se realizó un frotis que se dejó secar al aire y se incubó con la tinción preparada (0.055gr de azul de Coomassie, 12.5ml de metanol al 50%, 2.5ml ácido acético al 10% y 25ml de agua destilada), durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire para su posterior lectura en el microscopio electrónico con el objetivo 40x contando 200 espermatozoides como mínimo. El criterio que se empleó en éste método fue la observación de la tinción sobre el acrosoma de espermatozoides con acrosoma intacto, en cambio los espermatozoides reaccionados no se tiñeron en la región acrosomal, estos últimos fueron considerados como espermatozoides con reacción acrosomal prematura o daño acrosomal.

7.3.6 Tinción eosina-nigrosina (pre y post dilución):

Se mezcló una gota de 25µl de semen (fresco o diluido) con una gota de 10 µl de tinción de eosina-nigrosina (preparada con 0.67gr de eosina y 0.9gr de cloruro sódico en 100ml de agua destilada calentada suavemente y añadiendo 10gr de nigrosina) y se mezclaban. Una vez mezclado se colocaban 15µl de la solución en un porta objetos y se realizaba el frotis, la gota se extendía deslizando un cubre objetos delante de la gota. Se secaba al aire y observaba a 40x en el microscopio, haciendo un conteo mínimo de 200 células; los espermatozoides blancos (sin teñir), se consideraban vivos y los que poseen una coloración rosa o roja se clasificaban como muertos.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto del tiempo sobre integridad acrosomal en semen fresco y semen diluido mantenido a temperatura constante.

En el cuadro 1 se puede observar que en semen fresco mantenido sin diluyente (semen fresco), no se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar el número de acrosomas íntegros entre los diferentes tiempos analizados ni en la comparación de tiempo contra tiempo.

En el caso del semen diluido, la comparación entre grupos tampoco muestra diferencias significativas ($p > 0.05$)

Por otra parte la población espermática en el eyaculado fresco parece tener un ligero incremento en la variación de la integridad acrosomal, es decir existe el mismo número de acrosomas dañados pero con mayor dispersión (desviación estándar ligeramente más amplia) que en los grupos de semen diluido donde la desviación estándar tiende a ser similar en todos los tiempos.

Cuadro 1: Efecto del tiempo sobre la integridad acrosomal.

Tiempos	0 min (# de células)	15 min (# de células)	30 min (# de células)	60 min (# de células)
Integridad acrosomal en Semen crudo	192.90 ± 3.64 ^a	193.25 ± 2.60 ^a	190.05 ± 5.78 ^a	192.40 ± 4.96 ^a
Integridad acrosomal en Semen diluido	190.42 ± 6.39 ^b	191.67 ± 5.79 ^b	191.60 ± 5.43 ^b	190.35 ± 6.84 ^b

Se Presentan medias ± desviación estándar del número acrosomas íntegros

^a literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa (p<0.05)

8.2 Efecto del tiempo sobre la membrana espermática en semen fresco y semen diluido mantenido a temperatura constante.

En el cuadro 2 se puede observar que en semen fresco mantenido sin diluyente (semen fresco), se encuentran diferencias significativas (p<0.05) al comparar el número de espermatozoides vivos entre los diferentes tiempos analizados y en la comparación de tiempo contra tiempo.

En el caso del semen diluido, la comparación entre grupos si muestra diferencias significativas (p<0.05)

Por otra parte en la población espermática en el eyaculado diluido disminuye la variabilidad de los eyaculados, es decir, la cantidad de espermatozoides vivos se mantiene similar en las medias y en la desviación estándar que en los grupos de semen fresco donde la desviación estándar tiende a ser mas dispersa en todos los tiempos.

Cuadro 2: Efecto del tiempo sobre la viabilidad.

	0 min (# de células)	15 min (# de células)	30 min (# de células)	60 min (# de células)
Vivos eyaculado crudo	190.47 ± 7.58	190.63 ± 7.10	191.50 ± 6.90 ^a	190.80 ± 8.59
Vivos eyaculado diluido	190.4 ± 5.5	189.88 ± 5.78	189.33 ± 5.75 ^b	189.67 ± 5.8

Se Presentan medias ± Desviación estándar del número de células vivas

^a literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($p > 0.05$)

8.2.1 Efecto del tiempo sobre la viabilidad a diferentes días al compararlas con el día 0

En el cuadro 2b se puede observar que en semen en conservación mantenido con diluyente (semen procesado), se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar el número de espermatozoides vivos entre los diferentes días analizados al compararlos con el día 0. De igual manera se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar el número de espermatozoides con colas dobladas entre los diferentes días analizados al compararlos con el día 0.

El proceso de almacenaje *per se* va a presentar cambios en la integridad celular lo cual se comprueba al ver el decremento en espermatozoides con acrosoma íntegro y el aumento en anomalías del flagelo (colas alteradas).

Cuadro 2b: Efecto del tiempo de almacenaje por día en la viabilidad, integridad acrosomal y alteraciones del flagelo en semen diluido.

	Día 0 (# de células)	Día 1 (# de células)	Día 3 (# de células)	Día 5 (# de células)
Viabilidad	190.8 ±8.59^a	185.5±6.2^b	183.75±6.10^c	175.03±30.3^d
Acrosomas integros	190.42±6.39^a	185.97±7.27^a	184.55±7.46^a	179.80±10.45^a
Colas dobladas	6.02±4.4^a	8.6±4.7^b	8.92±3.5^c	11.36±4.29^d

Se Presentan medias ± Desviación estándar del número de células vivas
^a literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa (p>0.05)

8.3 Efecto del tiempo sobre la presencia de anomalías en semen fresco y semen diluido mantenido a temperatura constante.

En el cuadro 3 se puede observar que en semen fresco mantenido sin diluyente (semen fresco), no se encuentran diferencias significativas (p<0.05) en la morfología espermática entre los diferentes tiempos analizados ni en la comparación de tiempo contra tiempo.

En el caso del semen diluido, la comparación entre grupos tampoco muestra diferencias significativas (p<0.05)

Esto nos indica que el tiempo en semen fresco como diluido no afecta la morfología.

Cuadro 3: Efecto del tiempo sobre la morfología.

	0 min (# de células)	15 min (# de células)	30 min (# de células)	60 min (# de células)
Morfología Fresco	2.97 ± 2.45 ^a	3.71 ± 2.89 ^a	3.87 ± 2.15 ^a	2.40 ± 1.90 ^a
Morfología diluido	3.01±2.24 ^b	3.32 ± 2.29 ^b	3.86 ± 2.81 ^b	3.10 ± 2.41 ^b

Se Presentan medias ± Desviación estándar del conteo del número de células anormales presentes en el eyaculado.

^a literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($p > 0.05$)

8.4 Análisis de posible efecto de variabilidad en las muestras atribuida al seminal sobre la integridad acrosomal.

En el cuadro 4 se puede observar que en semen fresco mantenido sin diluyente (semen fresco), se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar el número de acrosomas íntegros entre los diferentes tiempos analizados y en la comparación de tiempo contra tiempo.

En el caso del semen diluido, la comparación entre grupos también muestra diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la tabla se puede observar variabilidad en la integridad acrosomal entre machos (hay diferencia significativa $p < 0.05$, es decir, las medias y la desviación estándar es más amplia) en semen fresco. Por el contrario en el semen diluido estas diferencias se pierden haciendo evidente la conservación de la integridad acrosomal, aunque este efecto no es apreciable y hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en la media y desviación estándar en el macho de mayor edad.

Cuadro 4: Efecto del individuo (semental) sobre la integridad acrosomal a los diferentes tiempos del estudio.

Semental	Ac Nor 0 min (# de células)	Ac Nor 15 min(# de células)	Ac Nor 30 min(# de células)	Ac Nor 60 min (# de células)	Ac dil 0 min (# de células)	Ac dil 15 min (# de células)	Ac dil 30 min (# de células)	Ac dil 60 min (# de células)
Berthrand	187 ± 3.7 ^a	190.7± 1.38 ^a	189.5±2.78 ^a	188.2±1.39 ^a	193.1±6.9	194.1±5.14	190.7± 7.25	191.6± 6.99
Caspian	195 ± 3.1	196 ±5.4 ^b	195±4.2 ^b	200±5.3 ^b	189.6±7.41	192.3±4.75	191.7± 3.54	190.2±5.01
Dorian	194.5 ± 2.6	190.5±1.6 ^a	189.5± 5.3 ^a	191.5±1.6 ^c	191.1±4.36	191.7±3.28	191.8±3..68	189.6±4.03
Keiser	195 ± 1.8	196± 4.3 ^b	182.2±7.87 ^c	194±3.7 ^c	194.2±3.95	196± 2.14	196.8± 2.3	196.5±2.45
Legolas	193 ± 4.2	193±4.2 ^c	194± 5.3 ^b	188.2±3.11 ^a	184.6± 5.4 ^a	184.1±5.33 ^a	196.7±4.59 ^a	183.7± 8.33 ^a

Se presentan medias ± desviación estándar

^a literales diferentes por columna presentan diferencia significativa (p<0.05) entre sementales

Ac Nor : Acrosomas normales en eyaculados frescos.

Ac dil : Acrosomas normales en eyaculados diluidos

8.5 Análisis de posible efecto de variabilidad en las muestras atribuida al semental sobre la morfología espermática

En el cuadro 5 se puede observar que en semen fresco mantenido sin diluyente, se encuentran diferencias significativas (p<0.05) al comparar la morfología espermática de los machos entre los diferentes tiempos analizados y en la comparación de tiempo contra tiempo.

En el caso del semen diluido, la comparación entre grupos no muestra diferencias significativas (p<0.05)

Por otra parte la población espermática en el eyaculado fresco a los 60 minutos en todos los individuos no presenta ninguna diferencia significativa, es decir, no hay una dispersión en la media y la desviación estándar, lo mismo que en los grupos de semen diluido, donde la media tiende a ser similar en todos los tiempos.

Cuadro 5: Efecto del individuo (semental) sobre la morfología a los diferentes tiempos del estudio.

Semental	vivos 0 (# de células)	vivos 15 (# de células)	Vivos 30 (# de células)	vivos 60 (# de células)	viv dil 0 (# de células)	viv dil15 (# de células)	viv dil 30 (# de células)	viv dil 60(# de células)
Bertrand	192± 7.71	180.2 ±8.73 ^c	189.13±10.29 ^c	189.75±8.43	191.25±7.54	189.63±6.7	187.38±8.18	188.88±7.06
Caspian	194 ± 3.59	195.75±2.12 ^a	194.88 ±3.4 ^a	195.5±3.02	192.75±2.38	192.5± 2.45	194±2.51	193.63±2.83
Dorian	182.75±4.62 ^a	184.75±4.03 ^b	186.75±4.89 ^b	187.63±4.93	185.88±3.8 ^a	183.± 3.68 ^a	186±3.25	185.37±4.87
Keiser	195.38 ± 5.6	196.38±2.07 ^b	196.5±2.07 ^b	195.25±3.77	192.13±5.89	194.39±5.26	191.63±5.1	191.13±5.44
Legolas	188.25 ±8.75	186 ±6.89 ^a	190.25±6.65 ^a	185.87±14.27	190± 4.81	189.75±3.28	187.63±4.81	189.38±5.85

Se presentan medias ± desviación estándar

^a literales diferentes por columna presentan diferencia significativa (p<0.05) entre sementales

9. Discusión:

Con la creciente expansión del comercio de semen, la garantía de calidad en la producción de dosis seminales para la inseminación artificial es cada vez más importante. Hasta ahora, se ha prestado atención a diferentes variantes del procesamiento de semen y a su impacto potencial en la calidad del semen de cerdo, sin embargo es una práctica recomendada que las dosis se elaboren en el menor tiempo posible después de la colecta y poniendo un tiempo límite de no más de 20 min.

En el presente estudio la revisión bibliográfica hace mención de dicha recomendación, pero se encontraron referencias muy genéricas sobre el efecto de periodos de tiempo más prolongados sobre las diferentes características morfo funcionales analizadas en este estudio. A continuación se presenta la interpretación de los resultados obtenidos con nuestro experimento:

- **9.1 Integridad acrosomal:**

Después de la eyaculación, los espermatozoides de cerdo son sensibles a la reducción rápida de temperatura, afectando la función de la membrana (M. Schulze, 2013) debido a la transición de fase lipídica y al reensamblaje de proteínas. Un mal manejo de la muestra debido a procesamiento con periodos de tiempo prolongados y estrés térmico (Trujillo Ortega, et al 2017) son factores que repercuten negativamente en la integridad acrosomal. En nuestros resultados no encontramos efecto negativo ($p < 0.05$) sobre la integridad de los acrosomas en la comparación entre tiempos ni entre grupos (cuadro 1), por lo que podemos inferir

que periodos de tiempo hasta de una hora entre la colecta y la dilución en semen mantenido a una temperatura de 37°C no presentan efectos detrimentales sobre la integridad acrosomal mientras se mantengan las condiciones de temperatura.

En este estado el almacenamiento a 16°C se extendió a 5 días para la observación de cambios estructurales, con el supuesto de que hay cambios en la fluidez de la membrana y en la integridad acrosomal durante el procesamiento del semen y el almacenamiento de la dosis seminal (cuadro 2b). Lo que se vio reflejado en las diferencias de viabilidad que disminuyen significativamente al quinto día ($p < 0.005$) siendo muy marcada la dispersión obtenida a las cinco días como respuesta individual de cada semental, lo que se refleja en la alta dispersión presentada (30.3) (cuadro 2). Reforzando lo anterior el número de anomalías se incrementa con el tiempo de almacenaje, como se ve en la tabla 2 donde se incrementan las colas dobladas en un 88.7% (de 6.02 a 11.36).

- **9.2 Viabilidad:**

Como ya se mencionó el almacenamiento provoca una mayor fluidez en la membrana, esto puede interferir con la selectividad que debe presentar una membrana funcional, las pruebas vitales tripán azul y esoina-nigrosina (utilizada en este estudio) (Trujillo Ortega, et al 2017) evalúan la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, siendo la evaluación de mayor importancia debido a que la membrana plasmática está relacionada con el metabolismo de la célula para mantener la motilidad, la capacitación, reacción

acrosomal e interacción del ovocito-espermatozoide (Rodriguez , 2003; Peña et al., 2005).

Todos los valores presentados (190 como media) a diferentes tiempos representan 95% de viabilidad entre sementales que son óptimos de acuerdo a lo aceptado, esto es lo recomendado por diferentes autores (Trujillo Ortega, et al 2017), estos valores se mantienen gracias al método de conservación y a la utilización del diluyente que permite mantener la vitalidad del espermatozoide.

- **9.3 Morfología:**

Las alteraciones o anormalidades en la morfología del espermatozoide se dividen según su origen en primarias, secundarias y terciarias. La presencia de espermatozoides anormales se conoce como teratozoospermia. Las anormalidades primarias ocurren en el testículo durante el proceso de la espermatogénesis. Las anormalidades secundarias se presentan durante el proceso de maduración a nivel del epidídimo. Las anormalidades terciarias (iatrogénicas) son originadas por un manejo inadecuado de la muestra, como puede ser un choque térmico. El porcentaje de anormalidades aceptado es de 25% (Trujillo Ortega, et al 2017).

Cuadro 6: clasificación de las anomalías espermáticas.

Clasificación de las anomalías espermáticas		
Primarias	Secundarias	Terciarias
<p>1.- Cresta nuclear Defecto en la protuberancia acrosómica.</p> <p>2.- Defecto en el tamaño de la cabeza: macrocéfalo, microcéfalo.</p> <p>3.- Defecto de la forma de la cabeza: ovalada, elongada, elíptica, piriforme, triangular, cuadrangular, achatada, alargada.</p> <p>4.- Defecto del flagelo: abaxial, corto, largo, grueso, delgado, múltiples flagelos.</p>	<p>Acrosoma vacuolado.</p> <p>Aglutinación de flagelo.</p> <p>Múltiples cabezas.</p> <p>Flagelo enroscado: segmento intermedio, principal o terminal.</p> <p>Gotas citoplasmáticas: proximal y distal</p>	<p>Flagelos doblados.</p> <p>Flagelos enrollados.</p> <p>Acrosomas dañados.</p> <p>Agregaciones.</p> <p>Aglutinaciones.</p>

El estudio de morfoanomalías no debe arrojar más de 20% de espermatozoides anormales, aceptándose como normal un 10% (Córdova y Muñoz, 2010), esto quiere decir que el semen utilizado en el estudio es de buena calidad, las formas anormales se determinaron antes y después del procesamiento en todos los eyaculados, fueron menor al 4% de morfoanomalías; lo que señala que los espermatozoides en general son de estructura normal; sin embargo se determinaron espermatozoides con cola

doblada, que al parecer presentan relación con el tiempo de almacenaje o dilución por disminución de la vitalidad. El enrollamiento de la cola puede deberse a fallas en la integridad o funcionalidad de la membrana, por lo que el espermatozoide busca compensarlo enrollando el flagelo.

- **9.4 Efecto macho:**

Desde hace tiempo se ha reportado que existen diferencias individuales con respecto a la tolerancia a la preservación entre los diferentes sementales. Esto se ha visto de manera marcada en la resistencia al daño por congelación (Medrano y Holt, 1998) donde no solo existen diferencias entre razas sino incluso entre individuos de la misma raza. Pero también se han visto diferencias evidentes entre sementales como respuesta a diferentes técnicas de procesamiento, semen fresco-refrigerado, semen congelado y semen sexado en valores como motilidad, viabilidad, lipoperoxidación de la membrana lipídica y fragmentación del DNA (Martin-Hidalgo, 2013) estas diferencias indican que la susceptibilidad entre individuos pudiera explicarse a variaciones mínimas en la composición de la membrana plasmática entre sementales. En nuestros resultados (cuadro 4) esta diferencia se hace notoria entre sementales al analizar la respuesta de la integridad acrosomal en semen fresco, la comparación entre grupos si muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) que podemos atribuir a dicha susceptibilidad individual, lo que a su vez se refuerza al ver que hay individuos con mayor dispersión en sus desviaciones estándar.

De manera interesante en el semen diluido las desviaciones estándar aparecen menos amplias por lo que podemos inferir que la acción del diluyente permite mantener la integridad acrosomal de manera más uniforme.

Por otra parte, la morfología analizada en grupo como hemos dicho no presenta variaciones significativas, pero al realizar el análisis por semental (cuadro 5), se ve claramente un pequeño grado de variabilidad individual presente en la morfología conforme a los diferentes tratamientos.

Estas variaciones individuales también fueron reportadas por Martin-Hidalgo y Cols (2013), que reportan diferencias en la motilidad espermática en un estudio comparativo entre la respuesta entre individuos y razas almacenados bajo diferentes extensores de larga duración, lo que refuerza los resultados que observamos en este estudio.

10. Conclusiones

- En el presente estudio, la integridad acrosomal y viabilidad espermática en muestras monitoreadas a diferentes tiempos y hasta 60 min durante la elaboración de dosis de semen de cerdo almacenado a 16°C, no presentaron cambios significativos a diferentes días de almacenamiento.
- El semen porcino procesado con diluyente comercial de larga duración y almacenado en refrigeración a 16°C por 5 días (120hrs), mantiene los valores de integridad acrosomal, morfología, supervivencia y pH en condiciones aceptables.

- Los cambios estructurales de las células espermáticas en el tiempo de almacenamiento, proveen información sustancial para tomar decisiones en el uso o descarte de material seminal almacenado a 16°C.

11. Sugerencias

- Por lo anterior, la implementación de un control periódico sobre los verracos facilitará la optimización o descarte del uso de las dosis seminales o del uso de los sementales, ya que existen variaciones individuales características en cada semental (efecto macho), por lo que con este monitoreo podemos clasificarlos como sementales para largos o cortos periodos de almacenamiento.

12. Referencias

1. Agrovit. Inseminación artificial en porcinos. [en línea]. 2008 (citado 4 de diciembre 2019) disponible en:
http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/insem_artif/GA000001in.htm
2. Aleman, O; Alfaro, M; Hurtado, E. Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas [En línea]. 2007 (citado 22 noviembre 2019) disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292006000300005
3. Becerril, Á. Manejo del semen: desarrollo de los programas de inseminación artificial. [En línea]. 2004 (citado 2 de noviembre 2019). Disponible en: <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar017>
4. Camacho, D. Y Morejon, E. Valoración de la Calidad de Semen Porcino Utilizando el Test de Endósmosis y Test de Resistencia Osmótica.2000. Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
5. Cidosa. Características del diluyente de semen porcino, (en linea). 2014 (citado 25 de noviembre 2019) Disponible en: <http://cidosa.net/noticias/caracteristicas-del-diluyente-de-semen-porcino>
6. Cordova, A. Y Muñoz, R. Características del semen de verraco y su evaluación práctica. [en línea]. 2010 (citado 15 de noviembre 2019). Disponible en: <http://66.147.240.151/~porcicul/articulos/?seccion=ia&tema=iar021>.
7. Equipo Técnico de KUBUS S.A. Manual de inseminación artificial porcina. Polígono industrial, Európolis (Internet) .2010.(consultado 15/nov/2019)

disponible en: <https://kubus-sa.com/wp-content/uploads/2014/06/KUBUS-Manual-de-Inseminacion.pdf>

8. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*.2000. 1469: 197-235.

9. Flowers, WL. Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated (en línea). 2002 (citado 20 de noviembre 2019). North Carolina, US. Disponible en: https://academic.oup.com/jas/article-abstract/80/E-suppl_1/E47/4829618?redirectedFrom=fulltext

10. Fuentes, P y Gadea, J y Me Donald, L. Resultados experimentales en el manejo reproductivo del verraco. Valencia, VE. [En línea]. 2005 (citado 26 de octubre 2019) disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2640/1/CD-0438.pdf>

11. Gadea, J. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Universidad de Murcia, España (en línea). 2007 (citado 18 de octubre 2019). Disponible en: <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/los-diluyentes-inseminacion-artificial-t26019.htm>

12. Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl*. 2005; 26: 396-404.

13. Hafez E y Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ta edición. McGraw-Hill Interamericana. México, DF; 2002.

- 14.** Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci. 2000 62, 143-172.
- 15.** Julca Salvador A.E. Conservación de semen porcino en refrigeración, usando el dilutor con agua de coco (cocus nucifera L.).2014. (en tingo maria-Perú). (tesis licenciatura): Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- 16.** Kubus, S.A. s.f. Aglutinación espermática (en línea). Boletín técnico, Madrid, ES. Disponible en https://kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero24_3.pdf.
- 17.** Landsverk, K. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: International Conference on Boar Semen Preservation (LA. Johnson y H.O. Guthrie, editors.). 2000. Maryland, 137-139 p.
- 18.** Lecoz, P. Inseminación Artificial, [en línea], La página del cerdo. 2005 (citado 2 de diciembre 2019) Disponible en:
<https://www.3tres3.com/buscador/0/0/index.php?secc=0&keyword=inseminacion+artificial>.
- 19.** M. Schulze, H. Henning, K. Rudiguer. Temperature management during semen processing: impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. Theriogenology.80,9, 990-998. 2013. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.026
- 20.** Maqueda, L. Conservación de la calidad del semen: diluyentes, empaque, temperatura y transporte (en línea). 2006 (citado 18 de noviembre 2019).
Disponible en: <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/conservacion-semen-diluyentes-empaque-temperatura-y-transporte-t25879.htm>
- 21.** Martín-Hidalgo D, Barón FJ, Robina A, Bragado MJ, Hutado de Llera A,

Garcia Marin LJ and Gil MC. Inter – and intra-breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and duroc boar semen during long term storage in MR-A and X Cell extenders. Anim Reprod Sci 139(1-4), 109-114. 2013. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.04.001

22. Medrano A y Holt WV. Variacion individual en la suceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado.1998. Arch. Zootec. 47:319-327.

23. Minitube of North America. Standards are key to reproductive performance (en línea). 2003. Spermnotes vol VII, numero 1, US. Disponible en <http://216.170.216.-90/spermnotes/noteframe.html> .

24. Oliva Trejo. J.A. Efecto de pH de un extensor de semen porcino sobre la calidad espermática. (Tesis licenciatura).2004. Universidad de San Carlos Guatemala;Cuatemal.

25. Parrilla I,Olmo D, Sijses L, Martinez-alborcia MJ, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA and Roca J. Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to with stand different semen-procesing techniques.132(1-2):66-73.2012. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.04.003.Epub

26. Peña FJ, Saravia F, Johannisson A, Walgren M, Rodríguez H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. International Journal of Andrology. 28(2):107-14. 2005

- 27.** Pig Improvement Company (PIC). Artificial Insemination, semen processing and quality control (en línea). 2003. Artificial Insemination technical update vol 1, numero 2, US. Disponible en: https://www.pic.com/usa/resources/files/AI_1_2-.pdf
- 28.** Prera, F. Utilización de feche descremada fluida UHT de bovino como extensor de semen fresco de verracos. (Tesis licenciatura) USAC/ FMVZ; 2002.
- 29.** Roche Alberto. Inseminación artificial porcina 1ª parte. [en línea]. 2014 (citado 10 de diciembre 2019) disponible en:
<https://www.porcicultura.com/destacado/Inseminaci%C3%B3n-artificial-porcina-1%C2%AA-Parte>
- 30.** Rodriguez MH. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Domest Anim.*; 38(4): 312-8; 2003. Doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x
- 31.** Singleton, WL. Guía básica para la recolección del semen porcino, evaluación y procesamiento (en línea). 2001. Disponible en:
<https://www.porcicultura.com/micrositio/Magapor/Procesamiento-de-las-Dosis>
- 32.** Trujillo Ortega. M,E, Contreras Ortiz AJ, Hernández Espinoza S, Gutiérrez – Pérez O, Herndez Trujillo E, Nava Navarrete JJ, *et.al.* El Verraco.2017.1ª edición. UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: (México).
- 33.** Veliz Porras, Y; González, LA. Manual de inseminación artificial en porcinos. 2003. Guatemala, GT. 10p.
- 34.** Vetefarm. Tecnología en inseminación. (En línea). 2011 (citado 22 de noviembre 2019) disponible en: www.1vetefarm.com/nota.asp?not=275&sec8.

35. Villa NA, Sánchez LE, Ceballos A. Actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en plasma seminal y sangre en cerdos reproductores. *Veterinary and animal science*. [En línea]. 2008 (citado 14 de noviembre 2019). Disponible en: <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v3n1a01.pdf>