

# **Congelación de semen de cerdo y evaluación de la calidad biológica pos descongelado**

**Harold Thomas Galo Osorto**

**Dennis Rolando Uclés Ramírez**

**ZAMORANO**

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria.

Diciembre, 2003

**ZAMORANO**  
**Carrera de Ciencia y Producción**  
**Agropecuaria**

**Congelación de semen de cerdo y evaluación  
de la calidad biológica pos descongelado**

Proyecto especial presentado como requisito parcial  
para optar al título de Ingeniero Agrónomo  
en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por

Harold Thomas Galo Osorto  
Dennis Rolando Uclés Ramírez

Zamorano, Honduras  
Diciembre, 2003

Los autores conceden a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Harold Thomas Galo Osorto

---

Dennis Rolando Uclés Ramírez

Zamorano, Honduras  
Diciembre, 2003

**Congelación de semen de cerdo y evaluación de la calidad biológica pos  
descongelado.**

Presentado por:

Harold Thomas Galo Osorto  
Dennis Rolando Uclés Ramírez

Aprobado:

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.  
Coordinador Carrera de  
Ciencia y Producción Agropecuaria

---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph.D.  
Decano Académico

---

Isidro Matamoros, Ph.D.  
Asesor

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

---

Miguel Vélez, Ph.D.  
Coordinador de Área Temática

## **DEDICATORIA**

H. T. G. O.

A DIOS quien me ha guiado para llegar hasta donde hoy me encuentro y seguir adelante; darme valor en los momentos de mi vida y haberme brindado la oportunidad de estudiar en Zamorano

A mi madre por su comprensión que me ha brindado siempre, ella que me ha guiado durante todo el tiempo y me ha apoyado para que pudiera realizar mis sueños.

A mi hermana Anny por haberme dado el apoyo que me dio durante mis tiempos difíciles.

A mi abuela Susana por sus sabios consejos y la atención que ha tenido para conmigo todo el tiempo.

A mi hermana Marlen la cual ha sido mi ejemplo a seguir, la cual me enseñó muchas cosas de la vida.

A todas aquellas personas que confiaron en mí y que han estado al pendiente durante todo este tiempo.

**DEDICATORIA****D. R. U. R.**

A DIOS Todopoderoso por darme la oportunidad de estudiar y culminar mis estudios en Zamorano y permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida.

A mis padres Renato Uclés Matute y Carmen Ramírez de Uclés por darme ese apoyo incondicional, esa confianza, y por el inmenso sacrificio que hicieron por mí; que Dios los bendiga siempre.

A mis hermanos Edwin, Carlos, Roger y Ma. del Carmen por su apoyo en todo momento, por estar siempre presentes en los momentos difíciles y por depositar toda su confianza en mí.

A mi tía Carmen, mi tío Evelio, mi tía Lila, mi tío Lando, mi tía Conda, mi cuñada Ana Lourdes y a toda mi familia por estar pendientes siempre de mi y por haber depositado su confianza en mí.

A todas aquellas personas que confiaron en mí y que han estado al pendiente durante todo este tiempo.

## **AGRADECIMIENTO**

**H. T. G. O.**

A DIOS por haberme guiado y por dejarme continuar.

A mi madre por su confianza, apoyo y comprensión que me ha brindado toda su vida.

A mis hermanas Anny, Marlen y María por darme su apoyo durante mis tiempos más difíciles y haberme brindado su amistad incondicional

Al Dr. Hincapié por haberme brindado sus consejos, conocimientos, paciencia, su buena voluntad, amistad, y su apoyo durante todo este tiempo.

Al Ing. Rogel Castillo por haberme brindado su conocimiento en todo momento y haberme guiado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Isidro Matamoros por su apoyo, consejos y amistad

Al Dr. Arturo Ferguson por haberme apoyado a mí y mi familia en momentos difíciles

A mi compañero de cuarto Julio Rendón por su amistad brindada y sus consejos en todo momento.

A mis amigos Marcos M., Enrique L., Julio S., Luis D J., Osmin N., Dayske S., Miguel G., Rosa R., Vanesa P., Federico A., Luis A., Edie A., Luis E., Jaime G., Sofía O., Katia D. Javier R., Carlos P., Allan F., Venancio F., Enrique S. Rigoberto E., Heidy C., Marlen D., Antonella C., Melisa M., Nelly A., Helen C., Wendy Z., Maria I., Francisco E., Esteban S., Dennis U., José E., Lorena P., Edgar F., Felipe Z., Jorge C. Oscar H., Andrea O., Maria Y., Fanny E., Enrique S., Emerson V., Ivan M., Lamar E., Francisco C., Javier L., Jairo M., Reiniero P., Carlos E., Diego V., Pedro G., Holguer B., Sebastián V. Ricardo B. y Víctor A. de más amigos por haber estado conmigo en mis buenos y malos momentos.

A los ingenieros María Bravo, Bayron Reyes, Luwbia Aranda, Jorge Venegas, por haber colaborado conmigo en la realización de mi proyecto.

A Martita por haber hecho que me sintiera lo mas cómodo posible en todo momento durante trabajé en mi tesis.

A Tomasa Colindres, Luz Henríquez, Erika Ramos, Soila Sandoval, por haberme prestado su ayuda y colaboración durante el experimento.

## **AGRADECIMIENTO**

**D. R. U. R.**

A Dios por ser mi compañero fiel de lucha, por darme a los padres que me ha dado y ser ellos mi mejor ejemplo de lucha y superación, por ser mi guía por el camino de la vida y porque jamás me ha abandonado y siempre me ha escuchado.

A mis padres Renato Uclés Matute y Carmen Ramírez de Uclés por ser lo máspreciado que tengo, por su eterna lucha y constante sacrificio, por haberme dado todo el apoyo económico, moral y sentimental durante toda mi vida y durante mi estadía en Zamorano y poder llegar hasta donde ahora estoy.

A mis hermanos Edwin, Carlos, Roger y Ma. del Carmen por su apoyo en todo momento, por estar siempre presentes en los momentos difíciles y por darme ánimos y fortalezas para salir adelante.

Al doctor John Jairo Hincapié por brindarme sus consejos, conocimientos, su alegría, su amistad y su apoyo durante todo este tiempo.

Al doctor Isidro Matamoros, por brindarme sus consejos, sus conocimientos, sus bromas y su amistad.

Al Ing. Rogel Castillo por su apoyo y amistad en todo momento y por guiarme en la realización de este estudio.

A mi compañero de Tesis, Harold Galo, por su paciencia, por su buen humor, sus bromas y por todo el apoyo brindado en todo momento durante este estudio.

A María Isabel, por ser tan especial, por apoyarme y estar siempre conmigo durante toda mi estadía en Zamorano.

Al programa "Food for Progress" de Zamorano, a la Secretaría de Agricultura y Ganadería, al Banco Central de Honduras y a mis benditos padres por todo el apoyo financiero que me brindaron para hacer este sueño realidad.

A todos mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo en todo momento.

A todas las personas que han formado parte de mi vida y que han hecho agradable mi estadía en Zamorano.

## RESUMEN

Galo, H.; Uclés, D. 2003. Congelación del semen de cerdo y evaluación de la calidad biológica pos descongelado. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 17 p.

La congelación del semen porcino no se ha desarrollado como se esperaba y su uso no ha llegado a los niveles de otras especies. Las razones que limitan la difusión del semen congelado porcino son: la técnica es costosa, el número de dosis por eyaculado es menor que el de semen refrigerado, una gran parte del semen de los cerdos no responde bien a la congelación, y las fertilidades máximas no alcanzan los valores del semen refrigerado. El objetivo fue determinar el efecto de la congelación y descongelación sobre los parámetros biológicos del semen. Se empacó el semen en viales de 0.5, 1.5, 5.0 y 10.0 mL a una concentración de 5 mil millones de espermatozoides por dosis. Las variables medidas fueron: motilidad en masa e individual, viabilidad, espermias normales y anormales. Se utilizó un diseño completamente al azar, un ANDEVA y un nivel de significancia de 0.05, los valores porcentuales fueron convertidos a la función arcoseno. El vial con mayor motilidad masal (38%), motilidad individual (29%) y viabilidad (30%), fue el de 0.5 mL en el cerdo PIC942. Los cerdos con más espermias normales fueron el PIC942 y PIC947 en todos los viales. Las anormalidades primarias y secundarias fueron menores en el cerdo PIC942 en todos sus viales. El vial de 0.5 mL ofrece los mejores resultados para las variables de motilidad en masa e individual y viabilidad. El tamaño del vial no afectó las variables de normalidades y anormalidades. El PIC942 fue el único cerdo del que se obtuvo semen con características congelables aceptables. Se recomienda utilizar viales con mayor área superficial y con menor volumen para obtener una congelación y descongelación uniforme.

**Palabras clave:** Anormalidades espermáticas, crioconservación, espermatozoide, inseminación artificial, motilidad, reproducción, verracos, viabilidad, vial.

---

Abelino Pitty Ph.D.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
LOCALIZACIÓN.....	3
ANIMALES.....	3
METODOLOGÍA.....	3
Recolección de semen.....	3
Evaluación Macroscópica.....	3
Volumen.....	3
Color.....	3
Olor.....	4
Consistencia.....	4
pH.....	4
Evaluación Microscópica.....	4
Motilidad en Masa.....	4
Motilidad Individual.....	5
Concentración.....	5
Viabilidad.....	5
Anormalidades Esperáticas.....	6
Protocolo de Congelación.....	6
TRATAMIENTOS.....	7
VARIABLES ANALIZADAS.....	8
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	8
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
MOTILIDAD EN MASA.....	9

MOTILIDAD INDIVIDUAL.....	9
VIABILIDAD.....	10
ESPERMAS NORMALES.....	11
ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS.....	12
Anormalidades primarias.....	12
Anormalidades secundarias.....	13
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>14</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>15</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>16</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1.	Evaluación del eyaculado de cerdo según la motilidad masiva según Holý (1987).....	4
2.	Clasificación de la calidad del movimiento individual progresivo de los espermatozoides.....	5
3.	Motilidad en masa del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).....	9
4.	Motilidad individual del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).....	10
5.	Relación área/volumen de los viales utilizados en la investigación y el vial que se utiliza comercialmente.....	10
6.	Viabilidad del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).....	11
7.	Espermas normales, del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial.....	11
8.	Disminución de espermas normales en semen fresco y descongelado, por verraco y vial (%).....	12
9.	Espermatozoides con anormalidades primarias, en semen frescos y pos descongelados por verracos y vial (%).....	12
10.	Espermatozoides con anormalidades secundarias en semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).....	13

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1	Viales utilizados en el experimento, 10, 5, 1.5 y 0.5 mL respectivamente de izquierda a derecha.....	7
---	--	---

## INTRODUCCIÓN

La porcicultura es un negocio lucrativo, en el cual el retorno de la inversión es rápido a diferencia del ganado vacuno, por lo que muchas fincas a escala mundial se dedican a esta actividad (Industria Porcina, 1998).

En los principales países productores de cerdos han realizado muchas investigaciones acerca de la reproducción y el mejoramiento genético, sin embargo la crioconservación es una técnica poco estudiada en comparación con otras especies (Industria Porcina, 1998). “La congelación de semen porcino no es una técnica nueva. De hecho, los primeros lechones producidos por inseminación artificial de cerdas con semen congelado, nacieron hace ya unos 30 años. Sin embargo, esta tecnología reproductiva no se ha desarrollado como se esperaba, al menos hasta el momento. Con todo, algunos profesionales del sector muestran interés por la técnica. La importación y exportación de semen de verracos de alta calidad genética y/o el sentido previsor de algunos, ante el riesgo de desabastecimiento que supondría una eventual epidemia (como la peste porcina clásica que azotó a Europa en el año 1998) son las razones que justificarían este interés. Por otro lado, revistas especializadas, congresos de veterinaria, paginas web, están difundiendo nuevos avances en congelación de semen de verraco y ha hecho correr el rumor de que la técnica funciona (Echegaray, 2001).

Según (Echegaray, 2001) la inseminación artificial porcina con semen refrigerado ha aumentado de forma espectacular en los últimos diez años. Sin embargo, el uso de semen congelado no ha llegado a los niveles de otras especies como la bovina. Las razones que limitan la difusión del semen congelado porcino son varias:

- La técnica es más cara.
- Existen varios métodos de congelación sin que se haya estandarizado ninguno.
- El número de dosis por eyaculado es menor y las dosis de semen congelado resultan 3 – 4 veces más caras que las de semen refrigerado.
- Solo un 20 – 30% de los verracos dan semen congelable.
- Entre los que responden bien, las fertilidades máximas no alcanzan los valores del semen refrigerado: la fertilidad al parto es al menos un 10 – 20% menor, con 1 – 2 lechones nacidos vivos menos.
- El semen congelado depende mucho de una buena detección de celo y del momento de la inseminación artificial para igualar su fertilidad a la de semen refrigerado.

Pese a todas estas dificultades, algunas experiencias piloto comienzan a mostrar resultados aceptables, con fertilidad en torno al 70%, que hacen pensar que está próximo el paso definitivo del terreno experimental a la aplicación práctica en las granjas (Echegaray, 2001).

La baja fertilidad obtenida inseminando con semen congelado se debe posiblemente a una combinación de los efectos detrimentales sobre la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso de congelado-descongelado. El semen porcino es muy susceptible a dichos procedimientos, especialmente al choque de frío. Los métodos estándar de congelación-descongelación empleados en otras especies no producen resultados equivalentes en el semen porcino debido a las diferencias en la susceptibilidad del semen de los individuos a la criopreservación y a que el semen de algunos cerdos sobrevive a la congelación con menor daño que el de otros, independientemente de su calidad inicial. A los primeros se les ha llamado “goodfreezers” y “badfreezers” a los segundos (Medrano y Holt, 1998).

El sistema y el protocolo de congelación también afecta la sobrevivencia espermática. La tasa de congelado modifica la dinámica de la formación de hielo y dónde éste se forma (intra o extracelular). Cabe añadir que la formación intracelular de hielo debe evitarse para reducir el daño celular. El sistema de envasado del semen es importante porque permite o interfiere con la disipación eficiente del calor (Medrano y Holt, 1998).

La especial sensibilidad al frío de los espermatozoides de verraco significa un problema científico y práctico cuando se trabaja en la criopreservación de semen porcino. Los espermatozoides del ganado porcino son extremadamente sensibles inmediatamente después de que son eyaculados junto con el plasma seminal. Sin embargo, la fracción rica en espermatozoides es más resistente que el eyaculado completo y puede tolerar al enfriamiento lento (Bwanga, 1990; citado por Córdova *et al.*, 2001; Gordon, 1997).

Basados en lo anterior, se realizó en Zamorano una investigación para determinar el efecto de la congelación y descongelación y de diferentes tamaños de pajuelas sobre el porcentaje de espermias normales, anormales, viabilidad, motilidad en masa e individual, determinar si existe en el grupo de verracos de la piara de zamorano alguno que produzca semen con características aptas para el proceso de congelación.

El sistema y el protocolo de congelación afectan la criosobrevivencia espermática. La tasa de congelación modifica la dinámica de la formación de hielo y el lugar (intra o extracelular) donde se forma; la formación intracelular de hielo debe evitarse para reducir el daño celular. El sistema de envasado del semen es importante porque permite o interfiere con la eficiente disipación del calor (Medrano y Holt, 1998) también se tiene que cuanto más rápida sea la descongelación mejor es la calidad de la dosis seminal (Echegaray, 2001).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó entre febrero y mayo de 2003 en la unidad de cerdos del Zamorano, ubicado a 32 km al SE de Tegucigalpa, Honduras, a una elevación de 800 msnm, con una temperatura media anual de 24°C y con una precipitación promedio de 1100 mm anuales.

### ANIMALES

Se utilizaron 5 reproductores estabulados en corrales de 2.5 X 3.0 m; a los que se les suministró 2 kg de concentrado por día; cada corral está equipado con bebedero de chupón. Los reproductores que se utilizaron fueron:

2 PIC (Pig Improvement Company)  
2 Yorkshire  
1 Landrace

Las edades de los verracos osciló entre uno y dos años. Se recolectó semen; una vez cada 15 días hasta obtener 2 eyaculados de cada cerdo, con la técnica de la mano enguantada.

### METODOLOGÍA

#### Recolección del semen

Los verracos se prepararon lavándoles la zona del prepucio. El semen se recolectó en un frasco de precipitados con una bolsa plástica adaptada por la parte interior, cubierto con un filtro de doble capa de tela gasa ajustado con una banda elástica.

#### Evaluación Macroscópica

El semen fue evaluado antes de la congelación y a los 15 días después de descongelado. Se realizó una evaluación macroscópica de:

**Volumen.** Se considera aceptable un volumen de 150 a 320 mL de eyaculado, se mide con beaker a 37°C. Ésta característica no refleja la capacidad del animal sino que está en función de la duración del estímulo (Zemjanis, 1987).

**Color.** El color debe ser lechoso, grisáceo lechoso o amarillo cremoso (Holý, 1987) y no debe contener detritos, pus o un color rojizo o rosado que indique presencia de sangre.

**Olor.** El semen fresco del cerdo sano tiene un olor típico. El olor a orina así como el olor a pútrido son indeseables ya que confirman enfermedades del testículo y de las glándulas sexuales accesorias o del prepucio (Holý, 1987).

**Consistencia.** El semen de buena calidad es denso, opaco y viscoso. Se clasificó según los siguientes aspectos:

Cre moso le choso  
Le choso opaco  
Opalescente  
Acuoso

**pH.** Se utilizó papel tornasol, el pH debe oscilar entre 6.8 y 7.4

### **Evaluación Microscópica**

La evaluación microscópica, se llevó a cabo antes del congelado y a los 15 días de descongelado. Se tomó una muestra de 1 c.c. de semen, el cual fue depositado en un tubo Eppendorf y se evaluaron las siguientes características:

**Motilidad en Masa.** Para la evaluación de esta característica se colocó una gota de 10 $\mu$ L y se observó al microscopio a 10X; se evaluó de acuerdo con la escala de Holý (1987) (Cuadro 1). El movimiento masivo está caracterizado por la formación de remolinos (olas espermáticas) que aparecen y desaparecen rápidamente. La intensidad del movimiento de los remolinos está en relación directa con la densidad y el porcentaje de espermatozoides vivos y su grado de actividad (Holý, 1987).

Cuadro 1. Evaluación del eyaculado de cerdo según la motilidad masiva según Holý

Motilidad Masiva	Descripción	Porcentaje de espermatozoides Vivos (%)
MM o	En el campo microscópico no se encuentran remolinos. Los espermatozoides están sin movimiento, o está muy débil.	Menos de 10
MM +	Los remolinos son muy lentos y suaves y la vitalidad está muy disminuida o hay gran cantidad de espermatozoides muertos.	10 - 40
MM ++	Movimientos masivos bien definidos, formación rápida de remolinos	40 – 60
MM +++	Movimiento masivo muy intenso con formación y desaparición rápida de remolinos.	Más de 60

Fuente: Holý, 1987

**Motilidad individual.** Se colocó una gota de semen de 20 $\mu$ L en 80 $\mu$ L de solución salina fisiológica (0.9% NaCl) y se cubrió con un cubre objeto, se miró en el microscopio a 40X, para evaluar esta característica se utilizó los tipos de movimientos descritos por Lamothe (1997) siendo los movimientos más comunes en los espermatozoides:

**Movimiento progresivo rectilíneo:** Las células espermáticas se mueven rápidamente en línea recta hacia delante.

**Movimiento circular:** Las células se mueven en círculo, debido a movimientos del cuello y la cola.

**Movimiento retroactivo:** Las células espermáticas se mueven en círculos hacia atrás.

**Movimiento pendular:** Las células espermáticas muestran movimientos espasmódicos de serpiente, sin progresión de lugar.

El porcentaje de células con movimiento individual progresivo presente en la muestra se clasificó de acuerdo con la escala propuesta por Zemjanis (1987)

Cuadro 2. Clasificación de la calidad del movimiento individual progresivo de los espermatozoides

Muy Buena	80% - 100%
Buena	60% - 80%
Regular	40% - 60%
Pobre	20% - 40%

Fuente: Zemjanis (1987)

**Concentración.** Se determinó utilizando la cámara de Burker, para lo cual se hizo una dilución en un beaker con 1 mL de semen, en 99 mL de solución espermicida compuesta de 10% de formaldehído y cloruro de sodio al 0.9%. Una vez llenada la cámara con 10 $\mu$ l de la dilución, se empezó el conteo cuando los espermatozoides se encontraron en reposo absoluto. Se utilizó un aumento de 40X. Se contaron 8 series de 5 cuadros cada uno por 3 veces y luego se promedió del conteo que fue multiplicado por el factor de dilución de 1:100.

**Viabilidad.** Para determinar esta característica se utilizó el método de Blom, de tinción con eosina que diferencia los espermatozoides vivos y muertos, la cabeza de los espermatozoides muertos se tiñe de rosado, mientras que los moribundos, se tiñen solo la parte caudal (Holý, 1987). Se usó solución acuosa de eosina al 1%, calentada a la temperatura del semen antes de ser utilizada.

**Anormalidades espermáticas.** Se utilizó la técnica descrita por Gonzáles y Muñoz (2002). Se usó rojo neutro para la morfología y azul de metileno para el acrosoma.

Las anomalías se dividen en dos (Zemjanis, 1987):

Anormalidades primarias: Cabeza  
Cuello  
Cola

Anormalidades secundarias: Cabezas normales separadas  
Separación del capuchón cefálico  
Colas flexionadas  
Presencia de corpúsculo protoplásmico:

- Proximal: Presente en la parte alta del cuello
- Distal: presente en la parte distal del cuello, a menudo acompañada de flexión de cola.

### **Protocolo de congelación**

La Técnica que se utilizó fue la aplicada en el Instituto Nacional de Investigación Agroalimentaria de España (INIA) (García, 2001) que consta de los pasos siguientes:

- Obtención de la fracción espermática del eyaculado.
- Dilución 1/3 con diluyente de refrigeración a 32°C.
- Equilibración durante 90 minutos a temperatura ambiente (20 - 22 °C).
- Equilibración a 15°C durante 120 minutos.
- Centrifugación a 800 x g durante 10 minutos en viales con  $5 \times 10^9$  spz.
- Eliminación del plasma seminal.
- Agregar 3.5 mL con Lactosa – Yema (A).
- Equilibración durante 120 minutos para disminuir a 5°C.
- Adición de 1.5 mL con Lactosa – Yema (A) + Glicerol (B)
- Congelación inmediata en vapor de nitrógeno a una altura de 5 cm, durante 20 minutos.
- Introducción en el nitrógeno líquido.

### **Descongelación:**

- Introducción de las pajuelas (viales) en baño María a 42°C durante 40 seg.
- Adición de 5 a 45 mL de medio de conservación (dilución 1/10).

**Composición de lactosa – yema (A):**

Lactosa-----8.8 g.  
Agua Destilada-----80 mL  
Yema de huevo-----20 mL

**Composición de lactosa – yema + glicerol (B)**

Lactosa –Yema-----95 mL  
Glicerol----- 5 mL

**TRATAMIENTOS**

El semen se empacó en viales de 0.5, 1.5, 5 y 10 mL a una concentración de 5 mil millones de espermatozoides por dosis.

Figura 1. Viales utilizados en el experimento, 10, 5, 1.5 y 0.5 mL respectivamente de izquierda a derecha.

**VARIABLES ANALIZADAS**

Las variables a medir con cada uno de los viales pos descongelado fueron:

- Motilidad masiva (%)
- Motilidad individual (%)
- Viabilidad (%)
- Espermas normales (%)
- Espermas anormales (%)

**DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los tratamientos fueron asignados en un Diseño Completamente al Azar (DCA). El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico SAS (1997). Se realizaron pruebas ANDEVA, diferencia mínima significativa y separación de medias. Los valores porcentuales fueron convertidos a través de la función arcoseno, el nivel de significancia exigido fue de 0.05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MOTILIDAD EN MASA

Solamente se encontró un cerdo (PIC942) con características de semen congelable aceptable en el vial de 0.5 mL, del cual se obtuvo una motilidad en masa del 37% (Cuadro 3), resultados que coinciden con los de Echegaray (2001), quien reporta motilidades en masa de 30 a 40% en semen pos descongelado, siendo este porcentaje el mínimo aceptable para poder utilizar el semen.

Cuadro 3. Motilidad en masa del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).

Vial (mL)	Y16		Y7		Landrace		PIC947		PIC942	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
0.5	85	0 <sup>c</sup>	85	0 <sup>c</sup>	75	0 <sup>c</sup>	90	0 <sup>c</sup>	95	37.5 <sup>a</sup>
1.5	85	0 <sup>c</sup>	85	0 <sup>c</sup>	75	0 <sup>c</sup>	90	0 <sup>c</sup>	95	11.6 <sup>b</sup>
5.0	85	0 <sup>c</sup>	85	0 <sup>c</sup>	75	0 <sup>c</sup>	90	0 <sup>c</sup>	95	5.00 <sup>b</sup>
10.0	85	0 <sup>c</sup>	85	0 <sup>c</sup>	75	0 <sup>c</sup>	90	0 <sup>c</sup>	95	6.25 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup>: Filas y columnas con iguales letras no tienen diferencia significativa. (P>0.05)

F = Semen Fresco      P = Semen Pos descongelado

### MOTILIDAD INDIVIDUAL

Solamente un cerdo (PIC942) con el vial de 0.5 mL tuvo una motilidad individual aceptable del 29% (Cuadro 4). De acuerdo con la literatura, sólo un 20-30% de los verracos, serán donantes satisfactorios de semen para congelación con un mínimo exigible de 30 a 40% de motilidad individual (Echegaray, 2001).

Cuadro 4. Motilidad individual del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).

Vial (mL)	Y16		Y7		Landrace		PIC947		PIC942	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
0.5	85.0	0 <sup>c</sup>	82.5	0 <sup>c</sup>	75.0	0 <sup>c</sup>	85.0	0 <sup>c</sup>	92.5	28.6 <sup>a</sup>
1.5	85.0	0 <sup>c</sup>	82.5	0 <sup>c</sup>	75.0	0 <sup>c</sup>	85.0	0 <sup>c</sup>	92.5	6.8 <sup>b</sup>
5.0	85.0	0 <sup>c</sup>	82.5	0 <sup>c</sup>	75.0	0 <sup>c</sup>	85.0	0 <sup>c</sup>	92.5	0 <sup>c</sup>
10.0	85.0	0 <sup>c</sup>	82.5	0 <sup>c</sup>	75.0	0 <sup>c</sup>	85.0	0 <sup>c</sup>	92.5	0 <sup>c</sup>

<sup>abc</sup> : Filas y columnas con iguales letras no tienen diferencia significativa.

F = Semen Fresco      P = Semen Pos descongelado

En este estudio el mejor resultado se obtuvo con el vial de 0.5 mL que tiene una mayor relación superficie/volumen (Cuadro 5), lo que concuerdan con la encontrada por Eriksson y Rodríguez (1999).

Cuadro 5. Relación área/volumen de los viales utilizados en la investigación y el vial que se utiliza comercialmente.

Vial (mL)	Área (cm <sup>2</sup> )	Relación área/vol.
0.5	12.4	24.8 : 1
1.5	13.6	9.1 : 1
5.0	26.1	5.2 : 1
10.0	45.9	4.6 : 1
Pajuela Comercial 5.0	39.7	8.2 : 1

Según Rillo *et al.* (1999) y Córdova *et al.* (2001) la congelación y descongelación del semen, reduce la motilidad hasta un 50% de la inicial. La disminución de la motilidad de los espermatozoides evaluados en esta investigación se encontró en ese mismo rango únicamente con el cerdo PIC942 en el vial 0.5 mL, en los demás fue de 100%.

## VIABILIDAD

Solamente se encontró un cerdo (PIC942) con una viabilidad aceptable de 30% en el vial 0.5 mL, valor similar al reportado por Ruiz *et al.* (1999) quienes obtuvieron viabilidades alrededor de 30% en semen pos descongelado, siendo este porcentaje el mínimo aceptable para poder utilizar el semen.

Cuadro 6. Viabilidad del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).

Vial (mL)	Y16		Y7		Landrace		PIC947		PIC942	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
	0.5	87	5.9 <sup>c</sup>	73.3	7.6 <sup>c</sup>	54.5	8.8 <sup>b</sup>	84	9.0 <sup>b</sup>	83.3
1.5	87	7.0 <sup>c</sup>	73.3	4.8 <sup>c</sup>	54.5	6.8 <sup>c</sup>	84	6.4 <sup>c</sup>	83.3	19.0 <sup>ab</sup>
5.0	87	5.8 <sup>c</sup>	73.3	4.6 <sup>c</sup>	54.5	6.8 <sup>c</sup>	84	3.3 <sup>c</sup>	83.3	16.8 <sup>ab</sup>
10.0	87	5.0 <sup>c</sup>	73.3	5.1 <sup>c</sup>	54.5	5.5 <sup>c</sup>	84	4.0 <sup>c</sup>	83.3	17.6 <sup>ab</sup>

<sup>abc</sup> : Filas y columnas con iguales letras no tienen diferencia significativa.

F = Semen Fresco      P = Semen Pos descongelado

La temperatura durante el proceso es determinante para la viabilidad ya que los espermatozoides son susceptibles a los cambios bruscos. Según Gordon (1997) cuando son eyaculados los espermatozoides de cerdos son muy proclives al daño por enfriamiento, con el paso del tiempo, los espermatozoides adquieren resistencia al enfriamiento, hecho que es tomado en consideración en los diferentes protocolos empleados en la crioconservación. Cuando son procesados para la congelación debe transcurrir un intervalo de 2-4 h antes de que se enfríen por debajo de los 15°C. Uno de los factores que más influyo en los resultados obtenidos, fue la centrifuga, ya que ésta no contaba con regulador de temperatura, por lo que la temperatura del semen aumentó de 15°C a temperatura ambiente.

## ESPERMAS NORMALES

Los cerdos que mantuvieron los mejores resultados en espermias normales fueron el PIC942 y PIC947 en todos sus viales, excepto en el de 10 mL del PIC947 que fue inferior ( $P < 0.05$ ) a los otros viales de ambos cerdos (Cuadro 7). Los resultados más bajos fueron presentados por el cerdo Landrace ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 7. Espermias normales, del semen fresco y pos descongelado por verracos y vial.

Vial (mL)	Espermias normales en %									
	Y16		Y7		Landrace		PIC947		PIC942	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
0.5	76	58.8 <sup>efgh</sup>	71	64.1 <sup>defgh</sup>	55	49.0 <sup>i</sup>	76	67.9 <sup>abcd</sup>	83	69.6 <sup>ab</sup>
1.5	76	64.4 <sup>cdef</sup>	71	55.5 <sup>h</sup>	55	44.8 <sup>i</sup>	76	70.5 <sup>ab</sup>	83	71.4 <sup>a</sup>
5.0	76	69.8 <sup>ab</sup>	71	58.0 <sup>gh</sup>	55	41.5 <sup>i</sup>	76	71.0 <sup>ab</sup>	83	69.4 <sup>ab</sup>
10.0	76	67.1 <sup>abcde</sup>	71	59.5 <sup>efgh</sup>	55	40.1 <sup>i</sup>	76	65.1 <sup>bcdef</sup>	83	70.9 <sup>a</sup>

<sup>abcdefghi</sup> : Filas y columnas con iguales letras no tienen diferencia significativa.

F = Semen Fresco      P = Semen Pos descongelado

En promedio por vial se encontró una disminución en el número de espermias normales del 14, 15, 14 y 16%, en los viales de 0.5, 1.5, 5.0 y 10.0 mL respectivamente (Cuadro 7), aunque las diferencias no fueron significativas. Según Córdova, *et al.* (2001), el porcentaje de los espermias normales de verraco después de la descongelación es alrededor

del 45%, inferior al obtenido en este estudio que fue sobre el 60 %, esta diferencia posiblemente se deba a los métodos para evaluar las anomalías ya que las técnicas utilizadas por estos autores, son más específicas que las que se utilizaron en esta investigación, en la cual solo se utilizó rojo neutro y azul de metileno.

En los eyaculados de todos los cerdos se encontró una disminución de los espermatozoides normales, los mejores resultados en el semen pos descongelado fueron obtenidos por los cerdos que presentaron los mejores resultados en semen fresco, con un 40% de espermatozoides normales como mínimo aceptable (Rillo *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 1999). La disminución de espermatozoides normales por efecto del congelado supera en todos los casos el 6% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Disminución de espermatozoides normales en semen fresco y descongelado, por verraco y vial (%).

Vial (mL)	Y16	Y7	Landrace	PIC947	PIC942
0.5	23	10	11	11	16
1.5	15	22	19	7	14
5.0	8	18	42	7	16
10.0	12	16	44	14	15

## ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS

### Anormalidades primarias

Se encontraron diferencias significativas entre los viales y entre los cerdos, sin embargo, no se tiene un patrón de comportamiento de los resultados que indique un efecto de los viales. El menor % de anomalías primarias lo tuvo el semen del cerdo PIC942 en el vial de 10 mL. En promedio por vial se obtuvo un aumento de anomalías de 176, 185, 190 y 184%, en los viales de 0.5 mL, 1.5 mL, 5.0 mL y 10.0 mL respectivamente (Cuadro 9).

Cuadro 9. Espermatozoides con anomalías primarias, en semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).

Vial (mL)	Y16		Y7		Landrace		PIC947		PIC942	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
0.5	3.8	11.3 <sup>abcde</sup>	3.5	9.6 <sup>cde</sup>	5.0	11.8 <sup>abcde</sup>	5.0	9.1 <sup>cde</sup>	2.5	9.8 <sup>bcde</sup>
1.5	3.8	11.1 <sup>abcde</sup>	3.5	12.3 <sup>a</sup>	5.0	13.3 <sup>abcde</sup>	5.0	10.0 <sup>abcde</sup>	2.5	7.9 <sup>de</sup>
5	3.8	9.4 <sup>cde</sup>	3.5	9.8 <sup>bcde</sup>	5.0	16.3 <sup>ab</sup>	5.0	10.3 <sup>abcde</sup>	2.5	9.8 <sup>bcde</sup>
10	3.8	11.0 <sup>abcde</sup>	3.5	9.4 <sup>cde</sup>	5.0	16.5 <sup>ab</sup>	5.0	12.8 <sup>abcde</sup>	2.5	6.9 <sup>e</sup>

<sup>abcde</sup>: Filas y columnas con iguales letras no tienen diferencia significativa.

F = Semen Fresco      P = Semen Pos descongelado

### Anormalidades secundarias

Se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre los viales y los cerdos, nuevamente el PIC942 tiene los mejores resultados y el mayor número de anomalías secundarias las tuvo el Landrace, que osciló en 40% en los 4 viales; al igual que en el caso de las anomalías primarias no se tiene un patrón de comportamiento del efecto del tamaño de los viales, pero sí por cerdo; en promedio se obtuvo un incremento del 22, 15, 14 y 20%, en los viales de 0.5 mL, 1.5 mL, 5.0 mL y 10.0 mL respectivamente (Cuadro 10).

Cuadro 10. Espermatozoides con anomalías secundarias en semen fresco y pos descongelado por verracos y vial (%).

Vial (mL)	Y16		Y7		Landrace		PIC947		PIC942	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
0.5	21	31.1 <sup>b</sup>	25.5	26.3 <sup>b</sup>	40	40.0 <sup>a</sup>	19.5	23.0 <sup>bc</sup>	14.8	20.5 <sup>c</sup>
1.5	21	22.0 <sup>bc</sup>	25.5	32.3 <sup>b</sup>	40	42.0 <sup>a</sup>	19.5	19.5 <sup>c</sup>	14.8	20.8 <sup>c</sup>
5.0	21	20.9 <sup>bc</sup>	25.5	32.5 <sup>b</sup>	40	42.3 <sup>a</sup>	19.5	18.8 <sup>c</sup>	14.8	20.9 <sup>c</sup>
10.0	21	21.9 <sup>bc</sup>	25.5	31.1 <sup>b</sup>	40	42.8 <sup>a</sup>	19.5	23.0 <sup>bc</sup>	14.8	22.0 <sup>c</sup>

<sup>abc</sup>: Filas y columnas con iguales letras no tienen diferencia significativa.

F = Semen Fresco      P = Semen Pos descongelado

En los eyaculados de todos los cerdos se tuvo un incremento de espermatozoides anormales. Los mejores resultados en el semen pos descongelado fueron obtenidos por los cerdos que presentaron los mejores resultados en el semen fresco. En todos los casos estuvieron por debajo del 60% de anomalías que es máximo aceptable en el semen según Rillo *et al.* (1999) y Ruiz *et al.* (1999).

## **CONCLUSIONES**

El PIC942 fue el único cerdo del que se obtuvo semen con características congelables aceptables.

El proceso de congelación y descongelación del semen de verraco afecta la viabilidad, motilidad en masa e individual y el porcentaje de espermatozoides normales.

El vial 0.5 mL ofrece los mejores resultados en las variables de motilidad en masa e individual y viabilidad. El porcentaje de espermatozoides normales no es afectado por el tamaño del vial.

## **RECOMENDACIONES**

Realizar futuras investigaciones utilizando diferentes temperaturas y tiempos en el proceso de congelación y descongelación

## BIBLIOGRAFÍA

Córdova, A; Pérez, J; Santiago, M. 2001. Temperatura de descongelación del semen de verraco y capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides congelados en pajillas de 5 mL. (en línea): (fecha de consulta: 15 de marzo de 2003). Disponible en: <http://www.congresocbta.unam.mx/PA15.htm>

Echegaray, A. 2001. ¿Para cuando el semen porcino congelado? (en línea): (fecha de consulta: 7 de marzo de 2003). Disponible en: <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/semconge.htm>

Eriksson, B.; Rodríguez, H. 1999. Viabilidad del semen de verraco congelado en envases planos. Lugo, España: II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. pp 364-367.

García, P. 2001. XXIV Curso Internacional de reproducción animal: Reproducción porcina. Madrid, España. p. 76.

González, B.; Muñoz, K. 2002. Determinación de la calidad biológica del semen congelado de la unidad de ganado lechero y doble propósito en Zamorano, Honduras. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguare, Honduras. 34 p.

Gordon, I. 1997. Reproducción controlada del cerdo. Ed. Acribia, Zaragoza. España. 267 p.

Holý, L. 1987. Biología de la reproducción bovina, Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y el macho. Trad. R. Barnet. 2 ed. La Habana. Ed. Científico-Técnica. 344 p.

Industria Porcina. 1998. Las montas naturales pierden participación en el mercado. Industria porcina. 18(2): 14.

Lamothe, C. 1997. Características del eyaculado. Tabasco, México: Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal. pp. 12-24.

Medrano, A. y Holt W. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado – descongelado. Arch. Zootec. 47: 319 – 327 p.

Rillo, M.; Romero, A.; Corcuera, B.; Garcia, C.; y Lleó B.; 1999. Efecto del semen congelado de porcino sobre el desarrollo embrionario. Lugo, España: II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. pp 369-376.

Ruiz, S.; Gadea, J.; Poto, A.; Coy, P.; Romar, R.; Campos, I.; Peinado, B.; y Sellés, E.; 1999. Validación de Crioprotectores en la congelación seminal porcina mediante fecundación in vitro (FIV) Lugo, España: II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. pp 382-384.

SAS. 1997. User Guide . Statistical Analysis System Inc., Carry NC. Versión 6.12. p 329.

Zemjanis, R. 1987. Reproducción Animal. Diagnósticos y técnicas terapéuticas. Trad. D. Pacheco. D.F. México. Ed. LIMUSA, S.A. 253 p.