

## EVALUACIÓN DE SEMEN PORCINO CONSERVADO EN DILUYENTES DE LARGA DURACIÓN. PRUEBAS IN VIVO

G. Ochoa<sup>1</sup>, M. J. Acosta<sup>2</sup>, Madelyn Rueda<sup>2</sup> y R. Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México  
email: rortega9\_@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Porcinas. Gaveta Postal 1, La Habana, Cuba  
email: mjacosta@iip.co.cu y mrueda@iip.co.cu

### RESUMEN

Se evaluó el comportamiento in vivo de los diluyentes Androhep, MR-A y Reading. Se inseminaron 225 cerdas de 0 a 5 partos, las cuales provenían de lactancias de 12 días. Para la preparación de dosis de semen colectado de ocho sementales adultos, machos híbridos terminales, dos veces por semana, y se utilizaron sólo eyaculados con un mínimo de 60% de motilidad en fresco. La dilución se realizó en los diluyentes Androhep, MR-A y Reading con una concentración de  $4 \times 10^9$  espermatozoides por dosis, las cuales se mantuvieron a 15-18°C, siendo utilizadas cuando tenían 0 a 36, 37 a 72 y 73 a 110 horas de conservación (0 a 1, 2 a 3 y 4 a 5 días respectivamente), según el grupo experimental. Las variables evaluadas fueron la tasa de concepción, tasa de partos y prolificidad.

No se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre diluyentes tanto en fertilidad como en prolificidad, aunque en esta última variable se aprecia una disminución, no significativa, a partir de las 37 horas de conservación en todos los diluyentes. Se pudo determinar que los tres diluyentes evaluados en la prueba in vivo mantienen buenos niveles de fertilidad y prolificidad hasta las 110 horas de conservación.

De acuerdo con este trabajo, el impacto biológico por efecto del uso de la inseminación artificial con diluyentes de larga duración establece, si vienen el comportamiento reproductivo en términos de fertilidad logra mantenerse estable; la productividad de la cerda podría verse afectada, con el uso del semen conservado por 4 a 5 días. Esto último tendría que ser evaluado contra beneficios aportados por el uso de los diluyentes de larga duración.

**Palabras claves:** cerdos, verraco, semen, diluyente de larga duración

**Título corto:** Evaluación in vivo de semen porcino

## EVALUATION OF PIG SEMEN PRESERVED WITH LONG TERM DILUENTS. IN VIVO TESTS

### SUMMARY

An in vivo evaluation of Androhep, MR-A and Reading semen diluents was conducted. Two hundred and twenty five sows from 0 to 5 parity and lactation periods of 12 days were inseminated. Insemination doses were prepared from semen collected from eight adult, terminal hybrid sires, twice a week. Only those ejaculated exhibiting a minimum of 60% motility in fresh state were used. Semen dilution was carried out by means of Androhep, MR-A and Reading, with an average  $4 \times 10^9$  spermatozoa per dose, which were kept at 15-18°C and thereafter were utilized when they had 0 to 36, 37 to 72 and 73 to 100 hours of conservation (0 to 1, 2 to 3 and 4 to 5 days, respectively), according to the experimental group. The studied variables were conception rate, farrowing rate and prolificity.

There were not significant ( $P < 0.05$ ) differences among diluents neither on fertility nor on prolificity, although in this last variable a non significant ( $P > 0.05$ ) diminution was noted after 37 hours of semen conservation in all diluents. It could determine that the three in vivo evaluated diluents kept a good level of fertility and prolificity up to 100 hours of conservation.

According to this experiment, the biological impact as affected by the use of artificial insemination with long term semen diluents indicates that although the reproductive performance in terms of fertility is stable, it could also be affected through sow productivity, if semen would be conserved for 4 to 5 days, and this should be evaluated taking into account profits derived from the use of long term semen diluents.

**Key words:** pig, boar, semen, long term diluent

**Short title:** In vivo evaluation of pig semen

### INTRODUCCION

El empleo de los diluyentes de larga duración en la conservación del semen porcino ofrece numerosas ventajas, dentro de ellas se tiene que permitirá una mejor planificación

de la colección y uso del semen, sobre todo en momentos de alta demanda, cuando se manejen grandes grupos de cerdas

o cuando se trata de un determinado semental (Flowers 1996). Se reducirá el desecho de semen por razones de caducidad, con una reducción concomitante en los costos de la inseminación artificial (IA) y se facilitará el envío de semen fresco de una región geográfica a otra. Por esto, en el futuro se presume un incremento en el uso de este tipo de diluyentes por parte de los centros de IA en México.

Algunos de estos diluyentes ya han comenzado a comercializarse en México, sin referencias en el país, que confirmen sus bondades como conservadores del semen porcino. Además, la información sobre este tipo de conservadores comienza a ser controlada a través de patentes, lo que incrementará la dependencia tecnológica de la industria porcina en México.

Por lo anterior, el presente estudio fue realizado para evaluar in vivo los diluyentes Androhep, Reading, y MR-A, como conservadores de semen porcino por períodos de hasta 5 días a temperaturas de 15 a 18°C. En un estudio anterior se hicieron evaluaciones in vitro de estos diluyentes de semen porcino (Ochoa et al 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se colectó la fracción rica del eyaculado de ocho sementales adultos mayores de 24 meses de edad de una compañía comercial (machos híbridos terminales) con un programa de recolección de dos veces por semanas para cada semental. La fase experimental tuvo una duración de 12 semanas. Se colectó la fracción rica mediante la técnica manual, en vasos tipo Berzelius de 350 mL, depositados en recipientes térmicos previamente atemperados a 37° C. El semen se filtró con gasa estéril para separar la porción gelatinosa, e inmediatamente se determinó la motilidad progresiva, la concentración ( $4 \times 10^9$ ) y la morfología espermática. Solamente se utilizaron eyaculados con un mínimo del 60% de motilidad progresiva.

Se inseminaron 225 cerdas Landrace x Large White (25:75), con 0 a 2 partos; las cerdas con partos previos se destetaron a los 12 días. Las cerdas se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos, uno para cada diluyente y con tres períodos de conservación, de acuerdo con el diseño experimental descrito en la tabla 1. Los números en cada celda indican el número de cerdas utilizadas por tratamiento el cual se define como el i-ésimo diluyente, en el j-ésimo tiempo de conservación del semen. Las cerdas fueron servidas progresivamente por grupos de acuerdo con el diseño experimental, esto es, primero se sirvieron las cerdas del grupo de 0-36 horas, posteriormente las de 37-72 y finalmente las de 73-110 horas de conservación de semen.

**Tabla 1. Diseño experimental de la prueba biológica**  
**Horas de conservación (días)**

Diluyente	0-36 (0-1)	37-72 (2-3)	73-110 (4-5)
Androhep	25*	25	25
Reading	25	25	25
MR-A	25	25	25

\*Número de cerdas inseminadas.

La detección de los celos se realizó dos veces por día con la ayuda de un verraco sano y activo. Las cerdas se inseminaron tres veces por estro, aproximadamente a las 12, 24 y 72 horas después de detectada la reacción de inmovilidad y en presencia de un verraco vasectomizado, utilizando un catéter tipo Melrose. Las dosis empleadas para la IA en cada cerda

correspondieron al mismo semental y a la misma edad de conservación (misma colección), para lo cual las botellas fueron identificadas con la fecha de colección y el número de semental. Además se utilizaron tapas de tres colores diferentes para identificar a cada uno de los diluyentes. La inseminación artificial de todas las cerdas fue practicada por el mismo técnico.

## Análisis estadístico

Las variables dependientes incluidas en el análisis fueron, la tasa de concepción y la prolificidad. Adicionalmente se incluyó la tasa de partos. La prolificidad fue definida como tamaño de camada al nacimiento. La tasa de concepción fue destinada como coeficiente porcentual del número de cerdas diagnosticadas gestantes a los 35 días, por ultrasonido y no retorno a celo, respecto al número de cerdas servidas. En este caso, el análisis estadístico se realizó por tablas de contingencia R x C, donde la dependencia de la tasa de concepción con respecto a diluyente y período de conservación se verificó mediante  $\chi^2$  para  $P < 0.05$  (Steel y Torrie 1988).

El modelo para el análisis estadístico de esta variable fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + (DT)_{ij} + b_1 X_{1i} + \epsilon_{ijk}$$

La descripción del modelo se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2. Modelo general usado en el experimento**

Ítem	Detalle
$Y_{ijk}$	Es una observación del tamaño de la camada al nacimiento.
$\mu$	Efecto común de todas las observaciones.
$(DT)_{ij}$	Efecto de interacción entre el i-ésimo diluyente y el j-ésimo día de conservación.
$b_1$	Estimador para el coeficiente de regresión parcial por el efecto lineal del número de parto ( $X_1$ )
$\epsilon_{ijk}$	El error experimental, con $\epsilon_{ijk} \sim NID^*(0, \sigma^2)$ .

Del modelo de análisis se derivaron las medias de mínimos cuadrados por efectos, empleando para su separación el procedimiento LSMeans (SAS 1986).

## RESULTADOS

### Tasa de concepción

La fertilidad, estimada por las tasas de concepción a 35 días, se mantuvo constante en los tres períodos de conservación y en cada uno de los diluyentes y, aunque no existen diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos, el MR-A presentó una mejor regularidad en este parámetro (tabla 3).

**Tabla 3. Resultados de tasa de concepción con el uso de semen conservado por 0 a 5 días en diluyente de larga duración**

Edad del semen, horas	Tasa de concepción (%) a 35 días		
	Androhep	MR-A	Reading
n	25	25	25
0 a 36	88	96	92
37 a 72	96	96	96
73 a 110	88	96	88
EE $\pm$	3.8	-	3.3

### Tasas de partos

Se presentan en la tabla 4, donde el MR-A presenta los promedios más bajos en los períodos de conservación de 0 a 36 horas y de 37-76 horas, aunque estadísticamente los tratamientos fueron iguales; sin embargo este efecto obedeció a la presencia de abortos en el último tercio de la gestación.

**Tabla 4. Resultados de tasa de partos con el uso de semen conservado por 0 a 5 días en diluyente de larga duración**

Edad del semen, horas	Tasa de partos		
	Androhep	MR-A	Reading
n	25	25	25
0 a 36	88	80	92
37 a 72	92	84	96
73 a 110	88	84	84
EE ±	1.9	1.9	5.0

### Prolificidad

De las variables contenidas en el modelo de análisis, únicamente el tiempo de conservación presentó una influencia significativa sobre el tamaño de camada al nacimiento (tabla 45), el resto es decir, interacción diluyente por período de tiempo, y la covariable número de parto, no tuvieron efecto sobre la prolificidad.

**Tabla 4. Análisis de varianza para prolificidad por efecto de la interacción diluyente x tiempo y número de parto**

Fuente de variación	gl	CM
Diluyente	2	5.97
Tiempo de conservación	2	26.52*
Diluyente x tiempo	4	1.25
Error	187	-
Total	195	-
R <sup>2</sup>	0.047	

• P<0.05

Las medidas de mínimos cuadrados derivadas del modelo muestran que estadísticamente no existen diferencias significativas entre tratamientos (tabla 5). Sin embargo, se aprecia una disminución general en el tamaño de camada al comparar el día 0 a 1, en relación con otros dos períodos de conservación. Los menores tamaños de camada en los días 0 a 36 y 73 a 110, se obtuvieron con el diluyente Reading, sin embargo, la diferencia no fue significativa (P>0.05).

**Tabla 5. Prolificidad en los diluyentes Androhep, MR-A y Reading (± E. E.)**

Edad del semen, horas	Tamaño de la camada		
	Androhep	MR-A	Reading
n	25	25	25
0 a 36	10.7	10.58	9.9
37 a 72	9.3	9.4	9.3
73 a 110	9.6	9.2	8.8
EE ±	0.5	0.5	0.5

### DISCUSIÓN

Las tasas de concepción obtenidas en el presente estudio indicaron que la fertilidad se mantuvo en los tres diluyentes

probados, durante los tres períodos de conservación, es decir, desde las 0 horas (día 1) hasta las 110 horas (días 4 a 5). Los resultados de Androhep y MR-A para fertilidad coinciden con lo hallado en otros estudios en términos de que este parámetro se mantiene constante hasta los días 5 a 6 (Ratto 1990; Weitze y Petzoldt 1992; Rillo et al 1993; Waberski et al 1994b; García 1994; Laforest y Allard 1995; Lyczynski y Kolat 1995). Contrariamente a los resultados de éste estudio, Korniewicz et al (1995) presentaron resultados con una disminución notable en las tasas de preñez, del 63.6 al 60.0% para el Androhep, y del 60.0 al 52.9% para el MR-A, en los días 3 y 5 respectivamente. Sin embargo, el semen diluido utilizado para este trabajo, fue conservado a temperatura ambiente. Lo anterior sugiere que el éxito con este tipo de conservadores puede estar íntimamente relacionado, entre otros factores, con una conservación óptima a temperaturas de 15 a 18° C.

En lo que se refiere a prolificidad, aunque en este trabajo no se encontraron diferencias significativas (P>0.05), posiblemente por el tamaño de la muestra, sí se observó una tendencia a disminuir en más de un cerdo el tamaño de la camada a las 37 a 72 horas y 73 a 110 horas (días 2 a 3 y 4 a 5, respectivamente), con respecto a las 0 a 36 horas (días 0 a 1), en los tres diluyentes. De acuerdo con esta tendencia, en el caso de los diluyentes Androhep y MR-A, los resultados de prolificidad son contrarios a los encontrados por estos investigadores (Watson 1990; Waberski et al 1994b; García 1994; Laforest y Allard 1995; Lyczynski y Kolat 1995), ya que ellos indicaron que el tamaño de la camada se mantiene al día 4 y 6 respectivamente. Con respecto al Reading, este diluyente mostró la misma capacidad que el MR-A y el Androhep para conservar la fertilidad. Sin embargo, no existen trabajos adicionales que permitan realizar comparaciones en términos de fertilidad y prolificidad.

Es importante señalar que en este estudio se realizó en condiciones de campo, de tal manera que no fue posible determinar el momento exacto de la ovulación, pero bajo estas condiciones resulta más fácil proporcionar recomendaciones sobre bases prácticas. Adicionalmente, con el esquema de montas por estro (tres) que se realiza en la explotación donde se llevó a cabo la prueba biológica, pudiera ser un elemento que está contribuyendo a favorecer una fertilidad aceptable hasta el último día de conservación del semen.

De acuerdo con este trabajo, el impacto biológico por efecto del uso de la inseminación artificial con diluyentes de larga duración establece, que si bien el comportamiento reproductivo en términos de fertilidad logra mantenerse estable; también podría verse afectada la productividad de la cerda, con el uso del semen conservado por 4 a 5 días, lo cual tendría que ser evaluado contra beneficios aportados por el uso de los diluyentes de larga duración.

La prueba in vivo establece que los diluyentes evaluados mantienen tasas de concepción superiores al 85% a los 4 a 5 días de conservación, mientras que la prolificidad logra mantenerse estable al mismo tiempo de conservación.

### REFERENCIAS

- Flowers, W.L. 1996. Performance expectations of different mating systems. In: Allen D. Leman Swine Conference. Saint Paul, 23:63-66
- García, R.J. 1994. Improvement in reproductive performance in pigs with artificial insemination and MR-A long term preservation diluent. In: 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners. Chicago, p 1-5

Korniewicz, B.B, Szczesniak-Fabianzyk, T. y Smorag, Z. 1995. The survival rete and fertilizing capacity of boar semen diluted whith different diluents. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 273-274

Laforest, J.P. y Allard, D. 1995. Comparision of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 255-256

Lycznski , A. y Kolat, K. 1995. Boar semen preservation in MR-A diluent. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 271-272

Ochoa, G. Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. Pruebas in vitro. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 15:239-245

Ratto, J. 1990. Reports about number of swine inseminations and farrowing results in Finland 1989. Comparison between two diluents, EDTA and MR-A. In: Second International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, p 45.

Rillo, S.M., Sánchez, R.S., Casado, P.G. y Artiaga, C.G. 1993. Técnicas de contrastación de semen de verraco. Revista Anaporc (Madrid), 128:5-16

SAS.1986. User's Guide (versión 6.03) Statistical Analysis System (SAS) Institute In Company. Cary, versión electrónica disponible en disco compacto

Steel, R.G.D. y Tome, J.H. 1988. Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw Hill Book Company In Company. México, Distrito Federal, p 27-28

Waberski, D., Weitze, K.F., Litmann, C., Lübbert zur Lage, F. Bortolozzo, P., Willmen, T. Ptzoldt, R. 1994a. The initial fertilizing capacity of long term-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. Theriogenology, 41:1367-1377

Waberski, D., Meding, D., Dirksen, G., Weitze, K.F., Leiding C. y Hahn, G. 1994b. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. Animal Reproduction Science, 36:145-151

Watson, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Marshall's Physiology in the Male, p 778-784

Weitze, K.F. y Petzoldt, R. 1992. Preservation of semen. Animal Reproduction Science, 28:229-235