

25  
12y



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"

"EVALUACION DE 4 EXTENSORES USUALES PARA SEMEN PORCINO POR MEDIO DE LA RECUPERACION ESPERMATICA, CONSERVADO EN REFRIGERACION (5 °C)."

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOTECNISTA  
P R E S E N T A N :  
DIAZ TORRES GERARDO JOSE ANTONIO  
VEGA TOVAR ADRIAN  
VILLEGAS RUBIO MIRIELA

ASESOR DE TESIS:

M. V. Z. MANUEL ALVAREZ TRILLANES



CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1987



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 está 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.

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
OBJETIVOS .....	26
MATERIAL Y METODOS .....	27
RESULTADOS Y DISCUSION .....	38
CCNCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	51
ANEXOS .....	53
BIBLIOGRAFIA .....	55

## RESUMEN

Se evaluaron cuatro de los diluyentes más usados en los países en que se practica la Inseminación Artificial con semen de cerdo refrigerado. La evaluación de los diluyentes se basó principalmente en la recuperación espermática que tuvo el semen diluido y almacenado en refrigeración (5°C), hasta 72 horas.

Se trabajaron 10 sementales, de cada uno se obtuvieron tres eyaculados, obteniéndose así un total de 30 muestras. Cada eyaculado se dividió en 5 partes, 4 partes para ser diluidas con 4 diferentes diluyentes en proporción 1:3 (v/v), y otra parte de semen no diluido que sirvió como control, posteriormente se almacenaron las muestras en refrigeración a 5°C.

Se evaluó la motilidad de cada eyaculado al momento de la obtención y después de ser diluido cada 24 horas, hasta cumplir 72 horas, - las muestras almacenadas en refrigeración fueron sometidas a un período de recuperación en baño María a 37°C durante una hora, antes de ser evaluadas. También se determinó el porcentaje de espermatozoides normales de cada muestra.

Los diluyentes evaluados fueron; el KHARKOV, el KIEV, el EGB (Egg yolk, Glucose, Bicarbonate), y el TRILL.

Los resultados obtenidos mostraron que el diluyente EGB fue el más eficiente en todos los aspectos evaluados, los diluyentes KHARKOV y TRILL mostraron buenos promedios pero inferiores a los del EGB, y el diluyente KIEV resultó con valores más bajos que los del control.

## I N T R O D U C C I O N

A través de los años, los antiguos cerdos se fueron modificando en forma y constitución y en la actualidad son prácticamente las mejores máquinas animales para la transformación de los diversos alimentos vegetales, en carne y grasa de gran calidad y exquisito sabor.

Todo ello se ha logrado a cambio de proporcionarles cada vez, mejores alimentos, mejoras genéticas y alojamiento adecuado, el cerdo ha respondido produciendo carne en el menor tiempo posible, con lo cual, los criadores obtienen ganancias normalmente.

La porcicultura ocupa un lugar destacado en el plan de desarrollo de la ganadería nacional, ya que el cerdo es un animal muy eficaz en la conversión de alimento, de gran rendimiento en canal y en la producción de carne de calidad.

Si se considera el rápido aumento demográfico de nuestro país y la baja tasa de producción de alimentos cárnicos para consumo humano, se observará que es de suma importancia realizar nuevas técnicas y métodos que eleven la cantidad y calidad genética de nuestros hatos para obtener animales con un mayor rendimiento.

Por ser la población porcina una importante fuente para el abasto, es necesario la aplicación de tales procedimientos, lo que repercutirá en el incremento de nuestra producción.

Se ha valorado el tremendo potencial genético que representa la inseminación artificial (IA) y se ha puesto al alcance del ganadero.

Teniendo en cuenta que la producción de carne de porcino tiene una enorme importancia y que los avances tecnológicos y de manejo de las explotaciones, ésta técnica va a determinar un gran incremento en la fertilidad y la prolificidad, ya que México es un país idóneo para la extensión y aplicación de la IA porcina.

La IA porcina como método para mejorar la calidad genética en el ganado porcino se utiliza actualmente en casi todo el mundo y nos ofrece la oportunidad de contribuir al aumento de los productos de origen animal, siempre que la IA se realice con semen de cerdos genéticamente superiores en pruebas de selección.

Actualmente se acepta el papel de la IA en la mejora ganadera, aunque sea algo sorprendente que en la especie porcina su desarrollo haya sido más lento que en otras especies, nos encontramos con la escasez de verracos dotados de alto valor genético que nos permita un progreso productivo de las explotaciones, la falta de estos verracos puede ser fácilmente compensada por el empleo de la IA que permite fecundar con el mismo número de reproductores un número de hembras 10 a 15 veces superior que con la monta natural (18).

Algunas de las ventajas que ofrece la IA son:

- Utilización al máximo de los reproductores de mayor valor genético, con lo que se puede realizar una rápida mejora en las granjas porcinas.
- Se puede inseminar de 6 a 12 hembras con un solo eyaculado, incrementando la influencia del verraco sobre el hato.

- Aislamiento sanitario de la explotación evitándose la entrada de nuevos reproductores eventuales portadores de enfermedades.
- Evitar la difusión de enfermedades infectocontagiosas o parasitarias por vía venérea.
- Disminución del número de verracos con el consiguiente ahorro de espacio, alimentación, alojamiento, etc.
- Ahorra tiempo para los productores que destetan grupos de cerdas y necesitan cruzar un gran número de ellas en corto tiempo.
- Evita el riesgo de utilizar animales muy grandes o muy pesados para el cruce con hembras primerizas.
- Disponibilidad de llevar registros detallados de apareamiento necesarios para un buen manejo del hato.
- Una valoración más rápida del semen gracias al análisis macroscópico y microscópico de éste, se evalúa el semen para determinar la utilidad del semental, lo que permite prescindir de sementales que presentan esperma de baja calidad, no debe confundirse la evaluación del semen con la prueba de fertilidad.
- Posibilidad de programación de cruzamientos interraciales para la obtención de híbridos comerciales.
- Evita pérdida de tiempo y estrés en los reproductores ya que no es necesario desplazar a los mismos (1,2,3,5,7,12,18,20,23).

Algunos de los inconvenientes que presenta la práctica de la IA son:

- Reducido número de dosis que se pueden obtener de un eyaculado semanal de verraco, ya que como máximo producen de 20 a 30.
- Mediante el semen pueden transmitirse organismos como Leptospira, Brucella, Bordetella y Erysipela.

- Tiempo de conservación del espermatozoide reducido, ya que hasta ahora solo se consigue un máximo de 5 días con espermatozoide refrigerado (18, - 20, 23).

En México no existe un centro de Inseminación Nacional, sino - utilización del método en grandes y pequeñas explotaciones colectivas. (17).

#### COMPOSICION QUIMICA DEL SEMEN DE VERRACO

Las primeras investigaciones sobre la composición química del semen de verraco fueron realizadas por Mc Kenzie, analizando su contenido para cloruro, glucosa, urea, creatinina, sólidos y nitrógeno - orgánico total ( Citado por Borton, 1965 ).

El semen de verraco tiene un alto contenido de ácido cítrico, - cuya misión sería intervenir en los procesos de gelificación, por el contrario es relativamente baja su concentración de fructosa, característica igualmente en el semen de verraco es la presencia de ergotio- neína que controlaría la motilidad espermática, y la de inositol, que tendría una misión nutritiva del espermatozoide (18).

Los resultados que reporta Mann sobre el estudio bioquímico del semen de verraco, revelan bajo contenido de fructosa y sorbitol, alto



contenido en ácido cítrico, ergotioneína e inositol comparado con la de otras especies (citado por Borton, 1965).

En otro estudio sobre la bioquímica del semen de verraco fue realizada por Graham, los análisis sobre carbohidratos, reportan que la glucosa, la fructosa y el sorbitol son metabolizados mientras que el manitol y glicerol sirven como intermediarios (citado por Borton, 1965).

Los aminoácidos fueron también aislados e identificados, encontrándose en mayor concentración el ácido glutámico y el ácido aspártico (1, 3).

El contenido de nitrógeno total varió de 400 a 800 mg/100 ml, el cual 14 a 28% es nitrógeno no proteico (1, 3).

Los estudios también reportan contenido de fosfolípidos, colesterol diglicérido, triglicérido y ésteres de cera. La fracción fosfolípídica del plasma seminal del verraco contiene todas las fracciones encontradas en el espermatozoide, esto es, fosfatidilcolina y etanolamina y esfingomielinas (26).

Los cationes predominantes son el sodio y el potasio en el plasma seminal, el cual contiene concentraciones bajas de calcio y magnesio. La concentración de sodio es mayor en el plasma seminal que en el espermatozoide, mientras que para el potasio ocurre lo contrario. El anión inorgánico principal en el plasma seminal es el cloro (26).

Las elevadas concentraciones de inositol en el semen de verraco provienen de las vesículas seminales y probablemente reemplacen al

cloruro de sodio en el plasma seminal al menos hasta cierto punto (26).

La ergotionefina que aparece en elevadas concentraciones en el semen de verraco, se forma en las glándulas vesiculares, pudiendo tener una función protectora para prevenir la oxidación del grupo sulfhidrilo - esencial para el esperma. La carnitina contribuye a la presión osmótica, actúa como cofactor en la oxidación de los ácidos grasos (26).

#### Composición Química del Semen

Constituyentes	
Sodio mg.	587
Potasio mg.	197
Calcio mg.	6
Magnesio mg.	11 (5-14)
Cloro mg.	330 (260-430)
Zinc $\mu$ g/ml.	31.8 (7.8-78)
Fructosa mg.	9
Sorbitol mg.	12 (6-18)
Acido cítrico mg.	173
Inositol mg.	530 (380-630)
Glicerilfosforilcolina mg.	(110-240)
Ergotionefina mg.	17
Proteína g/100 ml.	3.7

Análisis de semen entero. Los valores que se dan son los medios (mg/100 ml de plasma seminal (26).

## METABOLISMO DEL ESPERMA

Se cree por lo general que los espermatozoides están inmóviles, o casi, en el epidídimo y que su estado metabólico está en reposo. - Las condiciones de los túbulos son probablemente aeróbicas, al menos en la parte proximal al epitelio y aún así como generalmente se supone, los espermatozoides se encuentran en estado de reposo, al menos se espera algo de metabolismo basal para mantener la integridad de la célula (26).

Aunque los espermatozoides no tienen muchos organelos asociados con los procesos metabólicos, son metabólicamente activos, debido a que poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo las reacciones - bioquímicas de la glucólisis (vía Embden-Meyerhof), el ácido tricarbóxico, oxidación de los ácidos grasos, transporte de electrones y posiblemente de la vía de las hexosas monofosfato (9).

La relativamente alta concentración de ácido láctico en la luz epididimal, puede proporcionar un sustrato para el metabolismo del espermatozoide, aunque la glicerilfosforilcolina (GPC) está presente en grandes cantidades en el líquido luminal, los espermatozoides no la pueden utilizar directamente, el ácido glutámico se oxida solo lentamente y hay poca fructosa, glucosa o acetato presentes (26).

Los espermatozoides utilizan una variedad de sustratos en presencia de oxígeno, su actividad respiratoria proporciona los medios para utilizar lactato o piruvato que resulta de la fructólisis de azúcares has-

ta bióxido de carbono y agua. Esta vía oxidativa que aparentemente se localiza en las mitocondrias se considera más eficaz en la producción de energía que la fructólisis. Utilizando estos procesos catabólicos, - los espermatozoides convierten la mayoría de su energía en ATP, parte de ésta energía se debe utilizar para mantener la integridad de las - membranas que protegen a las células de la pérdida de sus componen tes vitales, la mayoría del ATP se utiliza en los procesos de motilidad (9).

Bajo condiciones anaeróbicas, el metabolismo de la fructosa en el - espermatozoide procede por medio de la vía Embden-Meyerhof, la hexosa fosfato, la triosa fosfato y el ácido pirúvico toman parte como inter mediarios que llevan a la formación de ácido láctico, el cual tiende a acumularse, aunque se oxida posteriormente en presencia de oxígeno -- hasta bióxido de carbono y agua en el ciclo de Krebs (26).

Esta actividad fructolítica permite al espermatozoide sobrevivir - en condiciones anaeróbicas en caso de almacenamiento para IA (9).

Al igual que la fructosa, el esperma puede utilizar glucosa mediante la vía glucolítica y el sorbitol que es un compuesto intermediario, puede oxidarse como fructosa y servir como nutriente, sin embargo se ha reportado que el espermatozoide de verraco no es capaz de oxidar el sorbitol (1,3,26).

El ácido cítrico presente en el plasma seminal no puede ser utiliza do fácilmente por los espermatozoides quizá por la relativa impermea

bilidad de la membrana espermática y mitocondrial por lo que no es una fuente importante de energía (26).

Los fosfolípidos constituyen la mayor fracción lipídica en el plasma seminal del verraco, no se conoce en que medida los espermatozoides utilizan los fosfolípidos plasmáticos, pero están claramente presentes como fuente potencial de energía al menos en el carnero (26)

La respiración endógena del plasmógeno intracelular puede proporcionar energía a corto plazo cuando se agotan los sustratos exógenos, la peroxidación del plasmógeno, ácidos grasos poliinsaturados y el palmitaldehído en los fosfolípidos de las membranas celulares, resulta en la formación de lisolecitina y otros componentes altamente tóxicos que destruyen la capacidad fertilizante del espermatozoide (9,19).

#### CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SEMEN DE VERRACO

El eyaculado del verraco ha sido descrito como diferente del semen de bovino y borrego, en virtud de su gran volumen y comparativa baja concentración espermática. Además los investigadores han encontrado que los espermatozoides del verraco son únicos en su comportamiento *in vitro* (1,3).

La especie porcina, desde el punto de vista de la inseminación artificial, está clasificada entre los animales de fecundación tipo uterina, caracterizándose por ser de eyaculación muy lenta, tarda en promedio 10 minutos, teniendo variaciones de 2 a 15 minutos y ser -

estimulada por presión, una vez terminado el coito la mayor parte del semen queda depositado en el útero. El semen eyaculado por estos animales, a diferencia de los de fecundación tipo vaginal, presentan un gran volumen, en promedio de 300 ml., con variaciones de 100 a 500 ml., - poca concentración de espermatozoides, la cifra media de concentración del semen de verraco es de 300000 espermatozoides por  $\text{mm}^3$ , con variaciones dependientes del volumen eyaculado de 45000 millones a 90000 millones por eyaculado (1,2,3,5,12,18,20,23).

El eyaculado del verraco es emitido en cuatro fracciones diferentes: Preesperma; es una fracción clara amarillenta que contiene gran cantidad de gérmenes. Fracción rica en espermatozoides; de color blanco lechoso, constituida por la masa de espermatozoides procedentes principalmente de la cola del epidídimo y de las ampollas de Henle. Fracción postesperma; es clara y pobre en espermatozoides. Tapioca; constituida por la secreción de las glándulas de Cowper o bulbouretrales y próstata, entre las fracciones siempre se producirán grumos de tapioca, que forma parte de la cuarta fracción (1,2,3,18).

En contraste otros autores mencionan solo tres fracciones, preesperma, rica en espermatozoides y postesperma, considerando a la tapioca o gel como parte de la primera fracción (5,10,20,23).

El pH varía de 7.3 a 7.9 y la temperatura promedio es de  $37^{\circ}\text{C}$  (18, 23,26).

Morfología espermática: En un eyaculado normal no debe admitirse - una cifra superior al 25 % de morfoanomalías espermáticas, dando - -

se una cifra media de 10 %, las morfoanomalías más frecuentes de los espermatozoides de verraco son: la presencia de gota citoplasmática, colas enrolladas o enroscadas y aumento de tamaño de la pieza intermedia (10,12,18,20,23).

Si el número de espermatozoides anormales aumenta, parece ser que también la viabilidad de los espermatozoides normales sufre un decremento. El aumento en la frecuencia de anomalías espermáticas causa una disminución en la fertilidad (14).

Uno de los factores que afecta la calidad del eyaculado es la frecuencia de eyaculación, Wallace (citado por Borton, 1965) notó que cuando verracos normales eran trabajados regularmente por un largo período de tiempo, había variaciones considerables en el volumen y la concentración del semen. Variaciones similares reportaron McKenzie et al., Ito et al. y Niwa (citados por Borton, 1965), también observaron que la frecuencia de eyaculación era un factor importante que afecta no solo el volumen y la concentración sino que también la morfología y la duración de la motilidad.

Niwa (citado por Borton, 1965) estableció que con una recolección con intervalo de 5 a 6 días no produce ningún efecto sobre la concentración y el volumen del semen. El también estableció que un verraco vigoroso puede ser usado una vez diariamente pero dos veces al día es sobretrabajarlo. Con un intervalo de 3 días se puede esperar un 70 a 80 % de espermatozoides normales.

Singh (citado por Borton, 1965) estimó que el promedio diario de producción de espermatozoides es de  $13.9 \times 10^9$ , sobre las bases de estos hallazgos el concluyó que un intervalo de 3-4 días entre las recolecciones era necesaria para una óptima concentración seminal.

Las eyaculaciones repetidas de un grupo de verracos durante 20 días y a intervalos de 4 días, 2 días y un día, produjeron cantidades totales de espermatozoides por eyaculado de  $54.9 \times 10^9$ ;  $39.5 \times 10^9$  y  $23.7 \times 10^9$  respectivamente. Esto sugiere la posibilidad de recolectar el semen de los verracos diariamente, con resultados satisfactorios. Los experimentos de depleción sugieren que el verraco produce alrededor de  $15.5 \times 10^9$  espermatozoides diarios y que los espermatozoides de la cola del epidídimo solo son eyaculados durante el agotamiento. La producción diaria de espermatozoides en el verraco se cuantificó por la histología testicular y las estimaciones varían desde  $16.5 \times 10^9$  hasta  $17.8 \times 10^9$  (23).

Mc Kenzie et al. (citado por Morton, 1965) reportó un incremento de espermatozoides anormales cuando aumenta la frecuencia de recolección. Niwa y Gerrits (citado por Borton, 1965) estimaron que un porcentaje promedio de espermatozoides anormales en verracos saludables es de 5 a 10% estos datos concuerdan con los de otros autores (7, 18, 23).

Otros factores que afectan la composición del eyaculado son la edad del verraco y la estación del año, la calidad del semen es claramente inferior durante los meses de verano en los que la temperatura del medio ambiente es mayor, el volumen de semen es más bajo durante las estaciones de máxima y mínima temperatura medio ambiental. Du-----



rante el verano disminuye la viabilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos (1,3,13).

La principal fuente de variación para la mayoría de las características del semen es principalmente el verraco, hay variaciones entre eyaculados del mismo verraco (1,3,14,15).

Los aspectos de manejo y nutrición no son esenciales para la producción de esperma fértil (1,3,22).

Anabiosis: Otra peculiaridad del espermatozoide de verraco concierne a su comportamiento durante la conservación, en la cual pierde rápidamente su motilidad. Esta propiedad del semen de verraco ha sido referida por los investigadores rusos y japoneses como anabiosis. Las células espermáticas que están bajo anabiosis pueden ser reactivadas por calentamiento a 37°C y agitación en presencia de aire. Como lo demostraron Polge y Niwa (citados por Borton, 1965) la reactivación puede requerir de dos a tres horas seguidas al periodo de almacenaje.

Crabo, Barker, Graham y Hunter (citado por Einarsson, 1973) en estudios de inmunofluorescencia de espermatozoides de verraco, demostraron que durante el almacenamiento el plasma seminal se precipita y se adhiere a la superficie del espermatozoide, esta propiedad tal vez se debe a que el plasma seminal del verraco contiene componentes, posiblemente de naturaleza proteínica. Einarsson demostró que la <sup>131</sup>I-albúmina adicionada al semen entero in vitro, se adhiere a la superficie del espermatozoide de verraco (6).

Esta peculiaridad del semen de verraco debe ser considerada en cualquier estudio en el cual la motilidad estimada está hecha de muestras almacenadas (1,3,5).

Mizuho et al. (citado por Borton, 1965) observaron una cercana relación entre metabolismo y anabiosis. Cuando el semen de verraco es almacenado a bajas temperaturas, la anabiosis ocurre más rápidamente que cuando el semen es guardado a altas temperaturas. En una prueba de control de sedimentación o anabiosis. Wettke et al. (citado por Borton, 1965) examinaron la influencia de la adición de la gelatina a varios diluyentes almacenados. En todos los diluyentes estudiados la gelatina fue efectiva en la reducción y prevención de la sedimentación, pero la motilidad - espermática fue así mismo reducida comparada con los controles libres de gelatina. También mencionaron que la anabiosis fue prevenida y el metabolismo mantenido siempre a bajas temperaturas por agitación. Esto puede tener una importancia práctica para el transporte de semen, puesto que la agitación en tránsito puede causar una pérdida de energía y viabilidad al mantener altos niveles metabólicos.

Prokopcev (citado por Borton, 1965) también notó que la agitación era dañina para el semen conservado. Las muestras de semen que han sido agitadas tienen un incremento en pH. El metabolismo del semen de verraco se incrementa con la agitación y calentamiento, por lo tanto se tiene que tomar en cuenta estos dos factores cuando se maneja el semen para no bajar su fertilidad y así poder obtener mejores resultados (1,2,3,5).

## CARACTERISTICAS DE UN BUEN DILUYENTE

Se han realizado estudios para formular diluyentes y procedimientos de almacenamiento específicos para el espermatozoide de verraco. En 1956 el Dr. Polge (citado por Kerekgyarto, 1977) describió detalladamente las técnicas de aplicación de la IA, pero los primeros resultados fueron decepcionantes. En 1959, en una convención de París se revisaron los progresos en éste campo; en ella se establecieron dos grandes problemas, la imposibilidad de conservar el semen por más de unas pocas horas y la dificultad para determinar el celo con exactitud (12).

Se deben utilizar sustancias puras y equipo limpio para excluir materiales tóxicos del ambiente espermático. Los diluyentes se deben preparar asépticamente y almacenarse por no más de una semana, a menos que se congelen (7).

Las características que se deben tener un buen diluyente son:

1.- Proveer de nutrientes adecuados a las células espermáticas, se añade por lo general un carbohidrato simple tal como la glucosa, fructosa o lactosa, estos ingredientes son los que se encuentran en mayor proporción en las fórmulas de los extensores. La ventaja de un azúcar sobre otro depende grandemente de otros componentes en el diluyente y del criterio que se este usando para evaluar los espermatozoides. En varios estudios estos azúcares, junto con los otros mono, di y trisacáridos han sido comparados. Hay una interacción entre el tipo de azúcar y la concentración de azúcar en el diluyente, mientras se incrementa la concentración de monosacáridos, mejoran los resultados de recuperación y supervivencia espermática, los altos niveles de di y trisacáridos tienen un efecto depresor sobre la recuperación de la célula. También se-

encontró que el tipo de azúcar en el diluyente a base de tris tiene un efecto también sobre la resistencia del espermatozoide de verraco al choque frío, la mejor recuperación y supervivencia espermática fue obtenida cuando el tris era combinado con fructosa (1,2,3,5,7,12,19,20,-21,25).

2.- Proteger contra los efectos dañinos del enfriamiento rápido, tanto la yema de huevo como la leche se utilizan para proteger contra el choque frío a las células espermáticas cuando se enfrían de la temperatura corporal a 5°C. Estas sustancias también contienen nutrientes que pueden utilizar los espermatozoides, proteínas o lipoproteínas son suministradas con el huevo, leche o caseína para proteger al espermatozoide durante el enfriamiento (1,2,3,5,7,12, 19).

Jakobsen y Mann (citados por Borton, 1965) notaron que la acción del diluyente a base de leche no era tanto proveer nutrientes adicionales sino más bien tiene un efecto protector. Ellos describieron acciones similares para la yema de huevo.

La yema de huevo entera da al espermatozoide de verraco muy poca o casi nula protección contra el choque frío. Si la fracción granular de la yema de huevo es removida por centrifugación, la fracción sobrenadante contiene lipoproteínas de baja densidad que parcialmente protegen al esperma contra el choque frío (19).

Mizuho et al. (citado por Borton, 1965) reportaron que ambos yema de huevo y leche preservaron una buena motilidad espermática, pero cau-

san también una aceleración de la respiración y la glucólisis, ellos disminuyeron la respiración y la glucólisis mediante la adición de azúcares a los diluyentes a base de leche o huevo.

La leche debe ser calentada a 95°C durante 10 minutos para inactivar la lactenina, que es una sustancia espermiotóxica presente en la leche (4).

La caseína es también parcialmente efectiva para prevenir daño al acrosoma del espermatozoide causado por el choque frío. Si se adiciona fosfatidilserina y colesterol a la caseína, mejora sus propiedades protectoras (19).

3.- Proporcionar un medio amortiguador para prevenir los cambios dañinos de pH con la formación de ácido láctico, se utilizan una variedad de amortiguadores para mantener un pH cercano a la neutralidad - tal como el bicarbonato de sodio, citrato de sodio, tris, tes y EDTA. - El citrato de sodio es un ingrediente común en los diluyentes para semen de bovino, varios autores reportan que el citrato parece ser tóxico para el espermatozoide de verraco. En contraste otros investigadores obtuvieron porcentajes satisfactorios de concepción utilizando diluyentes con citrato de sodio y yema de huevo. Estas anomalías fueron explicadas en parte por Niwa et al. (citado por Borton, 1965) quienes indicaron que el citrato de sodio es dañino para el semen a menos que sea mezclado con yema de huevo a una relación que no exceda de 4:1 v/v (1, 2, 3, 5, 7, 19, 20, 23).

Los diluyentes que contienen EDTA o catalasa mejoran la supervivencia del espermatozoide durante el almacenamiento en estado líquido (25).

4.- Mantener un equilibrio electrolítico y una presión osmótica es table de 308 m-osmoles, que es equivalente a la del semen, plasma sanguíneo y leche (7,25).

Las investigaciones realizadas para observar el efecto de la presión osmótica durante la preservación del semen de verraco han sido - conducidas por Stevermer et al. (citado por Borton, 1965) usando un - diluyente con leche descremada, la presión osmótica fué controlada añadiendo mesoinositol o D fructosa. Ellos concluyeron que la presión osmótica puede ser el factor más importante para mantener la motilidad y la fertilidad (2,3,5,19,20).

5.- Inhibir el crecimiento bacteriano, para inhibir el crecimiento de los microorganismos en el semen, la inclusión de agentes antibacterianos a los extensores de semen es una práctica común (2,5,7,19,20).

Mizuho et al. (citado por Borton, 1965) notaron que la combinación de penicilina estreptomocina era apropiada.

Polge y Rawson (citado por Borton, 1965) han demostrado que mejora la fertilidad. La más popular combinación de antibióticos en el - presente es penicilina estreptomocina (1,3,23).

Se recomienda que el semen se mantenga durante 30 minutos a 30°C para aumentar la acción antibiótica del diluyente (7).

6.- Aumentar el volumen del semen de tal manera que pueda utilizarse para inseminaciones múltiples (7,19,20).

Además debe proveer un medio ambiente que prevenga la formación de peróxidos grasos, la mayoría de los diluyentes de semen contienen constituyentes que ayudan a minimizar la peroxidación lipídica, como el citrato de sodio, EDTA, tris y ciertos componentes naturales del semen que previenen la formación de iones metálicos que actúan como catalizadores en los procesos peroxidativos (19).

Tal vez una de las funciones principales de un diluyente sea mantener la viabilidad y la capacidad de fecundación del espermatozoide durante su preservación in vitro durante el mayor tiempo posible (12).

Numerosos rangos de temperatura han sido investigados para el almacenamiento del semen de verraco. La conservación de semen porcino a las temperaturas usuales (alrededor de 5°C) resultó en muerte espermática, a altas temperaturas es relativamente más corta y su motilidad puede ser mantenida a temperaturas de 3°C a 10°C (1,3,18).

Polge (citado por Borton, 1965) sugirió que algunos factores presentes en el plasma seminal de verraco eran los responsables de la supervivencia a 20°C. Parece que una temperatura de 5°C a 12°C es la más satisfactoria para eyaculado fraccionado y de 15°C a 20°C para eyaculado completo (1,3).

El fenómeno de "choque térmico" ampliamente conocido que ocurre en otras especies, no ha sido bien estudiado en el esperma del verraco, ya que el volumen del eyaculado es grande, no es tan susceptible a las variaciones de temperatura del medio ambiente (1,3,7).

Algunos estudios indican que el plasma seminal de verraco contiene componentes, posiblemente de naturaleza proteínica, los cuales tienen una acción protectora sobre el espermatozoide durante el enfriamiento (6).

El grado de enfriamiento de la célula espermática es de igual importancia, el semen diluido sufre menos daño cuando se enfría lentamente que cuando su enfriamiento es rápido, en un enfriamiento lento el espermatozoide mantiene un 60% de la motilidad durante cuatro días, mientras que el espermatozoide que se enfría rápidamente sufre pérdida de la motilidad a las 24 horas (1,3,7).

Dziuk (citado por Borton, 1965) sugiere un rango de enfriamiento de menos de 5°C por hora.

La mezcla se enfría gradualmente hasta 5°C para todas las especies, excepto para el semen de verraco no congelado, que por lo general se mantiene a 15°C (7).

El semen se diluye a concentraciones específicas, de tal forma que el volumen de semen inseminado contenga suficientes espermatozoides para una elevada fertilidad sin desperdiciar muchas células. Los títulos de dilución varían en relación con la concentración de espermatozoides teniendo en cuenta que cada dosis debe tener un mínimo de 3000 millones (un eyaculado normal contiene de 20000 a 40000 millones de espermás) (1,3,7,18,20).

Ito et al. y Niwa (citados por Borton, 1965) recomendaron que la dilución no exceda de 1:6 V/V. Rodin y Lipatov (citados por Borton, 1965) notaron que 1:4 V/V da resultados satisfactorios.

Halt (citado por Borton, 1965) observó que la dilución de más de 1:10 V/V podía usarse sin pérdida de la fertilidad.



El espermatozoide de verraco no sobrevive tan bien en diluciones tan altas como 1:20 v/v, como lo hace en diluciones de 1:2, 1:4 o 1:8 v/v (1,3).

Varios investigadores demostraron que la concentración del semen debe ser de  $2 \times 10^9$  espermatozoides por inseminación o más. Las concentraciones fluctúan de  $2 \times 10^9$  a  $10 \times 10^9$  por inseminación y las tasas de concepción fluctúan de 32 a 71.5 %. Si la concentración se reduce, el número de inseminaciones potenciales se eleva, si se utilizan  $5 \times 10^9$  espermatozoides por inseminación (lo cual es común), solo es posible inseminar 8 machos por eyaculado, si se utilizan  $2 \times 10^9$  espermatozoides por inseminación se pueden inseminar a 20 hembras (23).

De manera general podemos decir que en la especie porcina se han utilizado todos los diluyentes del semen bovino, un gran número de diluyentes han sido utilizados con éxito variable. Los primeros intentos en 1930 iban encaminados a aumentar la cantidad de semen por dilución para inseminar varias hembras, sin tener en cuenta las exigencias de tipo metabólico para la viabilidad del espermatozoide y su posterior fertilidad (12).

Estos diluyentes solían ser a base de glucosa con la adición de pequeñas cantidades de sulfato sódico o tartrato potásico y peptonas. En Gran Bretaña, en los primeros experimentos de la porcina se utilizaron cuatro diluyentes (citrato-yema; fosfato-yema; glucosa-yema y glicina-yema), todos ellos con yema de huevo, con resultados algo decepcionantes (12).

Durante la pasada década, mejores procedimientos para la preservación a corto tiempo de semen de verraco en estado líquido han sido desa-

rollados. En el transcurso de los últimos años se han ensayado un buen número de diluyentes. Desde 1970. el diluyente Kiev ha reemplazado al - Illinois Variable Temperature (IVT), como el diluyente predominante en - Gran Bretaña y los países del este de Europa(19).

Uno de los diluyentes desarrollados, destinado al semen de bovino, se denomina IVT, porque se desarrollo en Illinois E.U., y mantiene la - viabilidad de los espermatozoides bajo temperaturas variables. El diluyente IVT se usa también para el semen de verraco, con resultados variables en - almacenamiento hasta por 5 días. Las tasas de concepción fueron de 76.5% cuando se utilizaron  $2 \times 10^9$  espermatozoides por inseminación (23).

En otros estudios llevados a cabo para comparar a los diluyentes IVT y Kiev, no se encontró ninguna diferencia en porcentajes de concepción - y tamaño de la camada, pero los autores decidieron cambiar al IVT por el Kiev debido a que el Kiev es más fácil de diluir (13).

El Beltsville L1 (BL1) y el SCK-7 son usados en limitadas extensiones de Francia y Gran Bretaña respectivamente. En América del Norte, - los diluyentes EGB (Egg yolk-Glucose-Bicarbonate), BL1 y Kharkov son los más frecuentemente usados (19).

El diluyente BL1 (Beltsville Liquid Extender) puede ser usado para - almacenar semen de verraco por más de 5 días. El diluyente BL1 es una - modificación del IVT, el BL1 es más simple de formular que el IVT debido a que el BL1 no requiere de saturación con bióxido de carbono (20).

La mayoría de las veces el semen diluido y almacenado en BL1 o

Kiev es usado el mismo día de la recolección o al día siguiente, después de ser almacenado a 15°-18°C. En un estudio realizado para comparar a los diluyentes BL1 y Kiev en condiciones prácticas en un gran número de cerdas, los resultados de fertilidad indicaron que el diluyente Kiev fue superior al BL1 (11).

Existen ya varios diluyentes para semen líquido, el desarrollado por Foley en la Universidad de Purdue se utiliza para almacenar semen a 15° o 5°C. Si se desea acumular por varios días, debe incorporarse yema de huevo (23).

Las condiciones óptimas de almacenamiento difieren entre los diluyentes, los espermatozoides extendidos en los diluyentes IVT y BL1 requieren de almacenamiento anaeróbico. En contraste, los espermatozoides extendidos en los diluyentes Kiev y Kharkov toleran condiciones aeróbicas y anaeróbicas. De cualquier manera un alto porcentaje de acrosomas normales fueron mantenidos durante el almacenamiento de espermatozoides extendidos en Kiev con un espacio de aire 4 a 8 veces el volumen del fluido, que en espermatozoides diluidos sin espacio de aire. La óptima concentración espermática para mantener la motilidad y la integridad del acrosoma fue de  $80 \times 10^6$  espermatozoides por ml. para el BL1, en contraste, los espermatozoides diluidos en el Kiev, el mantenimiento de la motilidad fue mejor en  $160 \times 10^6$  espermatozoides por ml. y la integridad del acrosoma fue mantenida a  $40 \times 10^6$  espermatozoides por ml. Aún cuando muchos de estos diluyentes han preservado la capacidad fertilizante de los espermatozoides por más de 6 o 7 días, en la práctica actual la mayoría del semen es usado para inseminación dentro de los 2 o

3 días después de la recolección. La mayoría de las veces el semen es usado el mismo día de la recolección o al siguiente día (19).

El Trill nombre designado al diluyente empleado por el MVZ Manuel Alvarez Trillanes, es usado en limitadas extensiones en México - (modificado de Carrillo Melgar, 1976 citado por Calderón, Quiroz y Zorrilla).\*

\* Comunicación personal.

## OBJETIVOS

- a) Evaluar cuatro de los diluyentes más usados en los países Europeos, Asiáticos y Americanos que practican la inseminación artificial con semen de cerdo refrigerado. La evaluación de los diluyentes se basará principalmente en la recuperación espermática que tenga el semen diluido y almacenado en refrigeración a 5°C, después de un período de almacenamiento.
  
- b) De acuerdo a los resultados, determinar cuales de los diluyentes son los más viables para desarrollar un programa de inseminación artificial en México.

## MATERIAL Y METODOS

El material utilizado para el presente trabajo de investigación es de dos tipos principalmente:

- A).- Biológico
- B).- De laboratorio

- A).- El material biológico a su vez consta de lo siguiente:
  - 1.- 10 sementales, de las razas Duroc, Hampshire y Yorkshire.
    - a) Semen fresco obtenido de los verracos (fracción rica en espermatozoides).
  - 2.- Hembras híbridas en calor, nacidas en la granja (usadas como potro de monta).
- B).- El material de laboratorio a su vez consta de lo siguiente:
  - 1.- Material para recolección de semen:
    - a) Tasa recolectora estéril
    - b) Gasa estéril
    - c) Tubo plástico colector estéril
    - d) Guantes estériles
    - e) Manga térmica
    - f) Caja térmica de poliestireno expandido
  - 2.- Material de valoración del semen:
    - a) Microscopio
    - b) Portaobjetos
    - c) Cubreobjetos
    - d) Pipetas Pasteur
    - e) Indicadores de pH

- f) Frascos de plásticos con tapa
- g) Colorantes (Eosina, Nigrosina, Rosa de Bengala)
- h) Tubos capilares
- i) Palillos de plástico
- j) Ampolletas color ámbar vacías y estériles
- k) Pipeta de Thoma o de dilución
- l) Hemocitómetro

3.- Material para la dilución del semen:

- a) 8 frascos goteros para cada uno de los ingredientes de las fórmulas (50 ml.)
- b) 4 frascos de plástico para preparar las fórmulas
- c) Baño María
- d) Parrilla eléctrica
- e) Matraces Erlenmeyer
- f) Termómetros de laboratorio
  - I) Termómetro de máximas y mínimas
  - II) Termómetro bimetalico con carátula de reloj
- g) Probeta de 1000 ml.
- h) Desclarador de aluminio
- i) Diluyentes estériles
  - I) EGB (Egg yolk-Glucose-Bicarbonate)
  - II) Kiev
  - III) Kharkov
  - IV) Trill
- j) Batas
- k) Balanza analítica

4.- Material variado

- a) Refrigerador doméstico a 5°C
- b) Esterilizador Zeyco
- c) Papel de estrasa
- d) Papel aluminio
- e) Papel higiénico
- f) Bolsas de polietileno
- g) Cinta adhesiva
- h) Etiquetas
- i) Selladora
- j) Mechero
- k) Calefactor para crear microclima de 37°C en el cuarto de laboratorio

La metodología que se siguió para la realización del presente trabajo - fue la siguiente:

- Descripción y zonificación del sitio de desarrollo de la investigación:

El presente trabajo se desarrollo en la granja porcina "El Olor", situada en el poblado de San Jacinto, Canal Bajo, área metropolitana de Salamanca Guanajuato, a los 20° latitud Norte y los 101°12' de longitud Oeste, a una altura de 1722 mts./SNM, con una precipitación pluvial entre 600-700 mm<sup>3</sup> anuales (8).

Se desarrollo en los meses de Enero, Febrero y Marzo con una temperatura de 15°a 18°C.

La granja cuenta con un manejo de ciclo completo, con fábrica de alimentos y laguna artificial, tiene una capacidad de 500 vientres y 30 -



sementales en un sistema de confinamiento completo o total, así como un área de engorda.

- Condiciones de manejo de vientres:

a) Detección de estros:

Para la realización práctica se ocuparon hembras en calor como potros de monta, dado que los sementales no estaban completamente adiestrados para usar el maníqufe.

Para detectarlas se pasaron a revisar jaula por jaula del hato que - estaba programado para entrar en calor, con el fin de detectarlas se observaron signos de vulva inflamada, secreción mucosa de la vagina y presión lumbar.

Posteriormente fueron separadas en las jaulas de monta con el macho seleccionado.

- Condiciones de manejo del semental:

a) Alimentación:

La alimentación de los sementales fue controlada para evitar que éstos aumenten de peso excesivamente por lo que se les daba un promedio de 2 kg de concentrado al día.

b) Medicina preventiva:

Se les vacunó contra cólera dos veces al año, se les vitaminó, despa

rasitó y se les baño contra la sarna mensualmente, también se les vacunó contra enfermedades pulmonares y gastrointestinales.

- c) Manejo; Se les paseó regularmente para que hicieran ejercicio y se aslearan. Su programa de trabajo de monta semanal fue de acuerdo a su edad, condiciones de salud y las necesidades de la granja. Los sementales primerizos se les adiestró y se les proporcionó el mejor manejo - posible durante sus primeras montas para evitar traumatismos e inhibiciones posteriores. A los sementales que están en producción también se les descansó regularmente de 7 a 15 días cada mes dependiendo de - su ritmo de trabajo.
- d) Instalaciones; Se alojaron en corrales individuales con pisos de cemento, divisiones metálicas y dentro de cada sementalera hubo cuatro jaulas individuales para hembras que estaban programadas para entrar en - calor. También cuenta con corrales de descanso que son de pisos de - tierra.

- Recolección del semen.

a) Preparación de recolectores de semen;

- Lavar, secar y esterilizar los recolectores de semen
- Colocar la malla filtradora (gasa estéril)
- Colocar el tubo colector, enrollarlo y unirlo a la taza colector
- Etiquetar e identificar cada recolector
- Colocarlo en la bolsa térmica

b) Preparar la cámara de control térmico

- Tener el baño María a 35°C
- Tener una caja de poliuretano con tapa para proteger al semen de la luz

c) Inmediatamente después de recolectar el semen, medir pH y temperatura con tiras reactivas y termómetro de carátula de reloj.

Para efectuar la recolección del semen, se debe contar con las instalaciones adecuadas para el confort del semental a trabajar. Esto se logró utilizando las jaulas sementaleras individuales, manejándolo lo menos posible y cuidando todos aquellos factores que distraigan la atención del semental.

Al no estar los animales completamente adiestrados a utilizar el potrero de monta, se substituyó por hembras en calor, fácilmente detectables dada la capacidad y tipo de manejo de la granja.

La hembra en calor fue conducida a la jaula sementalera en donde se aloja el semental seleccionado. Se observó el comportamiento sexual del semental, actitud hacia la hembra, tiempo que tarda en cortejarla hasta el momento de la monta.

Ya habiendo exteriorizado el pene el verraco, se procedió a manipularlo por medio de la técnica de la mano enguantada, tomando el glande y presionándolo en forma intermitente para favorecer la excitación del verraco, cuando el pene esta erecto se extiende suavemente hasta su límite y se desvia hacia afuera de la línea media, se mantiene firmemente

al costado del animal de monta.

Con la otra mano se sostiene el colector, cuando el verraco comienza a eyacular, se desecha la primera fracción de líquido transparente para recolectar la siguiente fracción, rica en espermatozoides. El filtro de gasa evita que la porción gelatinosa caiga al recipiente, cuando la eyaculación se vuelve gelatinosa casi por completo, se suspende la recolección.

Inmediatamente se tomó una tira reactiva con valores de 7 y 8 para medir el pH, la temperatura se tomó de igual forma con el termómetro y se notó una variación de 35°C a 37°C.

- Envío de muestras obtenidas al laboratorio. Inmediatamente después y protegidas de los cambios bruscos de temperatura así como de movimientos bruscos y de la luz del sol, se llevaron las muestras al laboratorio y se les puso a baño María a 35°- 37°C, para ser evaluadas y diluidas.

- Preparación de cada una de las fórmulas de los diluyentes, 100 ml - de cada uno ( anexo 1 ).

- Preparación previa de la tinción de Eosina-Nigrosina para determinar el porcentaje de espermatozoides normales ( anexo 2 ).

Inmediatamente después que llegaron los eyaculados al laboratorio, se tomaron unas gotas para evaluar la motilidad al microscopio.

a) Motilidad General: Esta se expresa como el porcentaje de células móviles, el porcentaje de motilidad va desde 0 a 100; la cifra citada en cada caso se refiere al número de espermatozoides que exhiben diversos grados de motilidad por cada 100 (10,23).

#### CLASIFICACION:

90 - 100%	Rápida formación de oleaje
80 - 90%	Buena formación de oleaje
70 - 80%	Pequeñas corrientes
60 - 70%	Movimiento pobre
40 - 60%	Motilidad escasa
Menos de 40%	Motilidad casi nula

Muy pocas muestras de semen superan el 90% de motilidad; los verracos con porcentajes inferiores al 50% no deben dedicarse a la reproducción en tanto no mejore su tanto por ciento de motilidad (10).

La evaluación se hizo inmediatamente después de la recolección, en una laminilla a 37°C, ya que el enfriamiento disminuye la motilidad. La observación se hizo al microscopio con un aumento de 100x.

b) Motilidad Individual: Algunos investigadores utilizan el término "motilidad progresiva", en el cual se incorporan la dirección y la tasa de células motiles (23).

La motilidad se gradúa según una escala de 1 a 10. La calificación de 10 indica que todos los espermatozoides móviles muestran un vigoroso desplazamiento en línea recta. La calificación va descendiendo hasta llegar a 1, que corresponde a un leve movimiento de la cola sin desplazamiento hacia adelante, los verracos con tipo 5 o inferior deben mirarse con escepticismo, sobre todo si se van a dedicar a un programa normal de reproducción. Escasas muestras sobrepasan la calificación de 9 (10).

La motilidad circular o de reversa es con frecuencia signo de choque frío o de un medio que no es isotónico con el semen. Con frecuencia ocurre motilidad oscilatoria en espermatozoides viejos o que están muriendo (7).

La evaluación se realizó de igual forma que para la motilidad general con un aumento de 400x.

c) Concentración Espermática: Para medir la concentración espermática se usó la técnica del hemocitómetro.

d) Morfología: El estudio morfológico permite distinguir espermatozoides normales de los anormales y determinar el tipo de anomalía, los resultados se expresan como porcentaje. La coloración de las muestras es de gran ayuda para diferenciar los tipos celulares anormales (23).

Se procedió a realizar los frotis de cada una de las muestras usando la técnica de tinción de Eosina-Nigrosina (Anexo 2).

Al mismo tiempo que se evaluó el semen, se tomaron 4 muestras -

de 5 ml. de cada eyaculado, para diluir en 15 ml. de cada diluyente, - (dilución 1:4 v/v).

e) Dilución del Semen: El diluyente se preparó antes de la recolección del semen y se mantuvo en refrigeración hasta poco tiempo antes de usarlo. El semen fresco recién recolectado se conservó a 30°C antes de diluirlo para evitar el choque frío. El semen y el diluyente deben estar a la misma temperatura cuando se efectúe la mezcla, esto se logró colocando el semen y el diluyente en baño María a 30°C. La mezcla se efectuó agregando el diluyente al semen en forma gradual.

Una vez hecha la dilución se tomó una muestra para evaluar los efectos sobre la motilidad espermática. Para determinar el pH del semen diluido se usó el mismo procedimiento que para el semen fresco.

Por otro lado se guardaron 20 ml. de cada eyaculado sin diluir para que sirvieran de controles. También se realizaron frotis de semen diluido.

La observación de los frotis al microscopio se realizó posteriormente con el fin de hacerlo detenidamente.

f) Almacenamiento: La mezcla semen-diluyente se mantuvo por varias horas antes de refrigerarla para permitir que las células se equilibraran con el diluyente.

Para el almacenamiento se dividió cada control y cada dilución en 3 partes para almacenarlas en ampollitas ámbar esterilizadas, selladas e identificadas. Una vez selladas se colocaron en baño María para que se enfriaran gradualmente y de ahí se pusieron en refrigeración a 5°C hasta por 72 horas.

Cada 24 horas se sacó una ampollita de cada control y de cada dilución para evaluar la recuperación espermática.

g) Evaluación de la Recuperación Espermática: El procedimiento para reactivar las muestras de semen almacenado en refrigeración fue manteniéndolo en baño María a 37°C durante una hora\* para dar tiempo a que las células espermáticas salgan del estado de anabiosis en el que se encuentran.

La evaluación de la recuperación espermática se basó principalmente en la motilidad general e individual, también se realizaron frotis de estas muestras.

\* Comunicación personal del MVZ Manuel Alvarez Trillanes. El ha observado que no hay una diferencia de una a dos horas como lo recomiendan otros investigadores.



## RESULTADOS Y DISCUSION

Como se puede apreciar en el ANOVA de cada una de las variables que se evaluaron ( motilidad general, motilidad individual y espermatozoides normales ) cuadros No.1, No.2 y No.3, se encontró que hay una - diferencia significativa cuando  $P < 0.05$  en cada uno de los tratamientos, - entre los diluyentes, entre los tiempos, entre los bloques (machos) y en la interacción diluyente por tiempo.

Lo que nos indica que hay un efecto directo de los diluyentes y el - tiempo sobre el semen de verraco conservado en estado de refrigeración a  $5^{\circ}\text{C}$ .

Las diferencias mínimas significativas que arrojaron la prueba de Rango Múltiple de Duncan para motilidad general nos indican en el tiempo 1 que el porcentaje del control que es ligeramente superior al porcentaje del diluyente EGB, sin embargo ésta diferencia no fue estadísticamente significativa, en cambio si hubo diferencia significativa de éstos, con respecto a los otros diluyentes (cuadro No.4).

T1 (0 Hrs.) - El control (a)  $84.33 \pm 4.09$   
- El mejor (a) el diluyente EGB  
 $83.66 \pm 6.55$   
- El más bajo (bc) el diluyente Kiev  
 $79.0 \pm 5.78$

T2 (24 Hrs) - El control (cd)  $76.33 \pm 4.13$

- El mejor (ab) el diluyente EGB  
87.5 ± 3.65 y el diluyente Kharkov  
80.66 ± 5.37
- El más bajo (de) el diluyente Kiev  
72.63 ± 7.03

- T3 (48 Hrs.) - El control (f) 64.16 ± 16
- El mejor (bc) diluyente EGB  
78.66 ± 11.51
  - El más bajo diluyente Kiev  
66.16 ± 6.39

- T4 (72 Hrs.) - El control (f) 61.85 ± 9.10
- El mejor (cde) diluyente EGB  
74.63 ± 10.46
  - El más bajo (g) diluyente Kiev  
61.33 ± 7.64

En general tenemos que el diluyente EGB presentó los mejores porcentajes de los 4 tiempos observados y el diluyente Kiev presentó los más - bajos porcentajes en los 4 tiempos.

Después del EGB le sigue el diluyente Kharkov, por los porcentajes - que mostró; en seguida tenemos al diluyente Trill que se comportó casi - idéntico al diluyente Kharkov. El control mostró mejores porcentajes de - motilidad general que el diluyente Kiev, no así con respecto a los de - más diluyentes.

Las diferencias mínimas para motilidad individual nos indican que en el tiempo 1, el control es semejante al diluyente EGB, y hubo diferencia significativa con respecto a los demás diluyentes.

- T1 (0 Hrs.) - El control (a)  $8.63 \pm 0.55$
- El mejor (a) diluyente EGB  $8.5 \pm 0.68$
- El más bajo (c) diluyente Kiev  $7.43 \pm 0.72$

En el tiempo 2 el diluyente Kharkov mejoró su promedio y no existe diferencia significativa con el diluyente EGB, pero sí hubo diferencia significativa con respecto a los demás diluyentes.

Entre el control y el diluyente Trill no hubo diferencia significativa.

- T2 (24 Hrs.) - El control (bc)  $7.76 \pm 0.56$   
Diluyente Trill (bc)  $7.76 \pm 0.62$
- El mejor (a) diluyente EGB  $8.46 \pm 0.50$
- Diluyente Kharkov  $8.36 \pm 0.66$
- El más bajo diluyente Kiev  $6.8 \pm 0.8$
  
- T3 (48 Hrs.) - El control (f)  $6.73 \pm 0.90$
- El mejor (bc) diluyente Kharkov  $7.66 \pm 0.8$
- El más bajo (f) diluyente Kiev  $6.6 \pm 0.8$
  
- T4 (72 Hrs.) - El control (ef)  $6.66 \pm 0.73$
- El mejor diluyente Trill (c)  $7.4 \pm 0.72$
- El más bajo (f) diluyente Kiev  $6.56 \pm 0.78$   
(cuadro No.5)

En el tiempo 4 el mejor diluyente fue el Trill, existiendo una diferencia significativa mínima con respecto al EGB y al Kharkov.

Resumiendo, para la motilidad individual, tenemos que el diluyente - EGB presentó buenos promedios, le siguen también con buenos promedios el diluyente Kharkov y Trill, en seguida el control y los promedios más bajos se encontraron los del diluyente Kiev.

La prueba de Rango Múltiple de Duncan para espermatozoides normales nos muestra que el tiempo 1 las diferencias entre los porcentajes -- del control, el diluyente EGB y el diluyente Trill, no son significativas -- en tanto que sí hubo diferencia significativa con respecto a los otros diluyentes. (cuadro No.6)

T1 (0 Hrs.) - El control (a)  $96.6 \pm 2.37$   
- El mejor diluyente EGB  $96.46 \pm 3.19$   
Diluyente Trill  $96.96 \pm 2.12$   
- El más bajo (cd) diluyente Kiev  $91.26 \pm 3.80$

En el tiempo 2 encontramos que los diluyentes EGB, Kharkov y Trill -- no muestran diferencia significativa entre ellos, pero sí hubo diferencia significativa con respecto al control y al diluyente Kiev.

T2 (24 Hrs.) - El control  $93.93 \pm 5.20$   
- El mejor (a) diluyente EGB  $96.4 \pm 3.03$   
Diluyente Kharkov (a)  $92.7 \pm 16.52$

Diluyente Trill (a)  $93.33 \pm 16.37$   
- El más bajo (f) diluyente Kiev  $81.73 \pm 6.80$

T3 (48 Hrs.) - El control (d)  $88.75 \pm 7.75$   
- El mejor (c) diluyente Trill  $92.16 \pm 2.27$   
Diluyente EGB (c)  $91.83 \pm 2.67$   
- El más bajo (e) diluyente Kiev  $86.46 \pm 6.55$

T4 (72 Hrs.) - El control (cd)  $89.86 \pm 6.43$   
- El mejor (cd) diluyente EGB  $90.76 \pm 2.35$   
Diluyente Trill (cd)  $87.50 \pm 16.80$   
- El más bajo (f) diluyente Kiev  $81.16 \pm 2.75$

En resumen, la tabla de la prueba de Rango Múltiple de Duncan para - determinar la interacción que los sementales pudieran tener sobre las variables estudiadas. (cuadro No.7)

Para motilidad general tenemos que el mejor semental fue el No. 4 -- ( $75.91 \pm 13$ ), y el que obtuvo el porcentaje más bajo fue el semental - No.8 ( $70.75 \pm 11.45$ ). La diferencia significativa entre el semental No.4 - y los demás sementales es mínima.

Para motilidad individual el semental que tuvo el mejor promedio - fue el No. 4 ( $7.81 \pm 0.81$ ). No hubo diferencia significativa entre los

sementales No.1, No.2, No.3 y No.6. No hubo diferencia significativa entre los sementales No.5, No.7, No.8, No.9 y No.10.

Para espermatozoides normales no hubo diferencia significativa entre los sementales No.1, No.2, No.3, No.4, No.6 y No.7. Los sementales restantes obtuvieron porcentajes más bajos y se mostraron semejantes entre sí.

CUADRO No. 1

ANOVA

MOTILIDAD GENERAL

TABLAS

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD n-1	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	DISTRIBUCION F	SIGNIFICIA P
TOTAL	596	27 315,58			
BLOQUES (MACHO)	9	10 844,9	1 204,98	45,9	0,005
TRATAMIENTOS	19	12 606,9	663,52	25,3	0,005
DILUENTE	4	3 394,07	848,61	33,3	0,005
TIEMPO	3	7 879,92	2 626,64	100,1	0,005
DILUENTE X TIEMPO	12	1 332,51	111,0	4,23	0,005
ERROR	561	14 708,68	26,21		

CUADRO No. 2

ANOVA

ESTILIDAD INDIVIDUAL

TABLAS

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD n-1	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	DISTRIBUCION F	SIGNIFICANCIA P
TOTAL	596	967.41			
BLOQUES (MACHO)	9	779.67	86.63	74.68	0.005
TRATAMIENTOS	19	306.17	16.11	13.88	0.005
DILUENTE	4	88.94	22.23	19.16	0.005
TIEMPO	3	100.46	53.48	46.10	0.005
DILUENTE X TIEMPO	12	56.77	4.73	4.07	0.005
ERROR	561	651.24	1.16		



CUADRO No. 3

ANOVA

ESPERMATOZOIDES  
NORMALES

TABLAS

TIPO DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD D-1	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIO	DISTRIBU- CION F	SIGNIFI- CANCIA P
TOTAL	597	22 699,94			
BLOQUES (HACHO)	9	1 213,15	134,7	9,10	0,005
TRATAMIENTOS	19	14 306	752,9	50,8	0,005
DILUENTE	4	6 609,35	1 652,33	112,65	0,005
TIEMPO	3	6 059,3	2 019,7	136,46	0,005
DILUENTE X TIEMPO	12	1 577,3	131,4	8,87	0,005
ERROR	564	8 393,04	14,8		

CUADRO No. 4

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN  
 DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA

MOTILIDAD GENERAL

	CONTROL	DILLENTE EGG.	DILLENTE KIEV.	DILLENTE KHARKOV.	DILLENTE TRIBS.
T <sub>1</sub> 0 HORAS	84.33 ± 4.09 ( 30 ) a	83.66 ± 6.55 (30) a	79 ± 5.7a ( 30 ) bc	78.16 ± 15.05 (30) ab	83 ± 5.01 (30) ab
T <sub>2</sub> 24 HORAS	76.33 ± 4.13 ( 30 ) cd	87.5 ± 3.65 (30) ab	72.83 ± 7.03 (30) de	80.66 ± 5.37 (30) ab	76.33 ± 5.07 (30) cd
T <sub>3</sub> 48 HORAS	84.16 ± 16 ( 30 ) f	78.66 ± 11.51 (30) bc	66.16 ± 6.39 (30) f	74.5 ± 8.13 (30) de	73.5 ± 7.44 (30) de
T <sub>4</sub> 72 HORAS	81.85 ± 9.10 ( 30 ) f	74.83 ± 10.46 (30) cde	61.33 ± 7.64 (30) g	70.5 ± 6.86 (30) a	71.66 ± 7.11 (30) e

DATOS REALES : PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR ( No. DE MUESTRAS ).

CUADRO No. 8

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN  
DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA.

MOTILIDAD INDIVIDUAL

	CONTROL	DILLENTE EG8	DILLENTE KIEV	DILLENTE KARKHOM	DILLENTE TRISS.
T <sub>1</sub> 0 HORAS	8.63 ± 0.55 (30) a	8.5 ± 0.68 (30) a	7.43 ± 0.72 (30) c	7.66 ± 0.66 (30) bc	8.16 ± 0.59 (30) ab
T <sub>2</sub> 24 HORAS	7.76 ± 0.56 (30) ba	8.46 ± 0.50 (30) a	6.8 ± 0.80 (30) def	8.36 ± 0.66 (30) a	7.76 ± 0.62 (30) bc
T <sub>3</sub> 48 HORAS	6.73 ± 0.90 (30) f	7.26 ± 0.94 (30) cd	6.6 ± 0.80 (30) f	7.66 ± 0.80 (30) bc	7.26 ± 0.78 (30) cde
T <sub>4</sub> 72 HORAS	6.66 ± 0.73 (30) ef	7.26 ± 0.78 (30) cde	6.56 ± 0.85 (30) f	7.26 ± 0.73 (30) cd	7.4 ± 0.72 (30) c

DATOS REALES: PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR ( No. DE MUESTRAS ).

C U A D R O N o. 6

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN

DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA.

ESPERMATOZOIDES NORMALES

	C O N T R O L	DILLENTE EGB.	DILLENTE KIEV	DILLENTE KHARKOV	DILLENTE TRISS.
T <sub>1</sub> 0 HORAS	96.6 ± 2.37 ( 30 ) a	96.46 ± 3.19 (30) a	91.26 ± 3.19 (30) cd	90.83 ± 17.93 (30) b	96.96 ± 2.12 (30) a
T <sub>2</sub> 24 HORAS	93.93 ± 5.20 (30) b	96.4 ± 3.03 (30) a	81.73 ± 6.80 (30) f	92.7 ± 16.52 (30) a	93.33 ± 16.37 (30) a
T <sub>3</sub> 48 HORAS	88.76 ± 7.76 (30) d	91.83 ± 2.67 (30) a	85.46 ± 6.55 (30) a	91.66 ± 2.48 (30) cd	92.16 ± 2.27 (30) c
T <sub>4</sub> 72 HORAS	89.86 ± 6.43 (30) cd	90.76 ± 2.36 (30) cd	81.16 ± 2.75 (30) f	86.9 ± 3.35 (30) a	87.50 ± 16.80 (30) cd

DATOS REALES : PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR ( No. DE MUESTRAS ).

C U A D R O No. 7

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN  
 CUADRO GENERAL POR SEMENTALES.

MACHO	MOTILIDAD GENERAL	MOTILIDAD INDIVIDUAL.	E. NORMALES
1	75.16 $\pm$ 12.31 (60) ab	7.55 $\pm$ 0.50 ( 60 ) ab	92.13 $\pm$ 6.4 (60) a
2	75.84 $\pm$ 10.67 (60) ab	7.55 $\pm$ 1 ( 60 ) ab	93.28 $\pm$ 4.7 (60) a
3	73.81 $\pm$ 12.77 (60) ab	7.54 $\pm$ 1.16 ( 60 ) ab	92.5 $\pm$ 5.41 (60) a
4	75.91 $\pm$ 13 (60) a	7.81 $\pm$ 0.81 ( 60 ) a	92.36 $\pm$ 5.92 (60) a
5	76.16 $\pm$ 7.15 (60) ab	7.5 $\pm$ 0.72 ( 60 ) b	90.18 $\pm$ 7.41 (60) b
6	73.83 $\pm$ 9.53 (60) b	7.65 $\pm$ 0.79 ( 60 ) ab	92.16 $\pm$ 4.90 (60) a
7	73.75 $\pm$ 17.72 (60) ab	7.46 $\pm$ 1.04 ( 60 ) b	92.21 $\pm$ 5.74 (60) a
8	70.75 $\pm$ 11.45 (60) c	7.2 $\pm$ 1.14 ( 60 ) b	90.01 $\pm$ 7.95 (60) b
9	75 $\pm$ 7.75 (60) ab	7.45 $\pm$ 0.87 ( 60 ) b	89.9 $\pm$ 5.71 (60) b
10	75.5 $\pm$ 9.46 (60) ab	7.48 $\pm$ 0.98 ( 60 ) b	90.5 $\pm$ 6 (60) b

DATOS REALES : PROMEDIO  $\pm$  DESVIACION ESTANDAR ( No. DE MUESTRAS ).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos de motilidad general a las 0, 24, 48 y 72 horas, el mejor diluyente comparado con el control fue el EGB. Los diluyentes Trill y Kharkov mostraron buenos promedios pero inferiores a los del EGB y no muestran diferencia significativa entre ellos. El diluyente Kiev fue el que tuvo los más bajos valores aún por debajo de los del control.

Para la motilidad progresiva el mejor diluyente fue el EGB a las 0 y 24 horas, sin embargo hacia las 48 y 72 horas mostró valores inferiores a los de los diluyentes Kharkov y Trill respectivamente. La motilidad progresiva mostrada por los espermatozoides diluidos en el Kharkov mostraron una variación extraña de las cero a las 24 horas y de las 24 a las 48 horas, esto puede ser debido a los métodos subjetivos de evaluación. El diluyente Kiev tuvo los más bajos promedios.

Los resultados de espermatozoides normales demuestran que los mejores diluyentes fueron el EGB y el Trill. El diluyente Kharkov tuvo porcentajes inferiores a los del EGB y Trill pero superiores a los del control. En el diluyente Kiev fue donde más espermatozoides anormales se encontraron. Esto puede ser debido a que el diluyente Kiev es hipertónico con el semen, la osmolaridad del semen es de 308 m-osmoles y la del Kiev está calculada en 369 m-osmoles (25, 19).

O bien puede deberse a que el citrato de sodio que es tóxico para la célula espermática, le haya causado algún daño (3).

Se observó también que hubo una interacción del tiempo, la motilidad

general e individual disminuta a medida que el tiempo pasaba.

En general podemos decir que el mejor diluyente fue el EGB en todos los aspectos evaluados, por lo que se recomienda su uso para almacenar semen de cerdo en refrigeración hasta por 72 horas, además de que su formulación es más sencilla.

Los diluyentes Trill y Kharkov se recomiendan para conservar semen hasta por 48 horas en refrigeración.

Se sabe que uno de los principales factores que afecta la calidad del semen es el verraco mismo y que aún hay variaciones de un eyaculado a otro del mismo verraco (1,3,14,15).

Estas variaciones fueron controladas en parte mediante la selección de verracos previamente evaluados. Se observaron diferencias significativas mínimas entre los 10 sementales usados para la realización del presente trabajo.

ANEXO " 1 "

COMPOSICION DE LOS DILUYENTES EVALUADOS EN EL PRESENTE TRABAJO  
(5,11,19,20).

	EGB	KIEV	KHARKOV	TRILL
1.- Glucosa g.	30	60	52.77	
2.- Citrato de sodio g.		3.75	2.8	
3.- Bicarbonato de sodio g.	1.5	1.20		
4.- E.D.T.A. g.		3.70	1.11	
5.- Yema de huevo %	30		5	20
6.- Tris g.				22.71
7.- Acido cítrico g.				12.76
8.- Fructosa g.				5
9.- Penicilina U.I.	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
10.- Estreptomicina g.	1.0	1.0	1.0	1.0
11.- Agua bidestillada ml. (cbp)	1000	1000	1000	1000



## ANEXO " 2 "

Técnica de tinción Eosina-Nigrosina para la observación de la morfología en los espermatozoides de verraco.

Solución acuosa de Nigrosina al 1 %

Solución acuosa de Eosina al 5 %

Semen diluído 1:100 en citrato de sodio al 2.9 %

Agregar sobre un portaobjetos cóncavo una gota de Eosina, después una gota de semen, enseguida dos gotas de Nigrosina. Se mezcla agitando - con un palillo, se deja transcurrir un minuto y finalmente se toma una - gota de la mezcla y se realiza el frotis.

**Nota:** Todas las soluciones y el material de cristalería deben estar a una temperatura de 35-37°C. Se obtienen mejores resultados utilizando pipetas Pasteur como goteros. (Herrick J.B. y Self J.L. 1965; con modificaciones de Moss J.A. et al. 1976) (10,16).

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez T.M. (1974). Curso de Inseminación Artificial en Porcinos. Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal. Secretaría de Agricultura y Ganadería.
- 2.- Alvarez T.M. (1983). La Inseminación Artificial en las Cerdas. Mimeoógrafo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 3.- Borton A.; Jaworski A. and Nelor J.E. (1965). Factors Influencing the Fertility of Naturaly and Artificialy Mated Swine. Research - Bulletin 8.
- 4.- Bernabe S.M. y Tello A.M. (1985). Correlaciones Entre la Motilidad Progresiva y las Anormalidades Acrosómicas en el Semen de Carnero Fresco y Congelado en Pastillas en Tres Diferentes Diluentes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 5.- Calderón F.Q.; Quiroz M.I. y Zorrilla T.E. (1976). Inseminación Artificial en Cerdas. Apuntes de Postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mimeoógrafo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 6.- Einarsson S. (1973). Deep Freezing of Boar Spermatozoa. World Rev. Anim. Prod. 9, 45-51.
- 7.- Foote R.H. (1985). Inseminación Artificial. En Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4<sup>a</sup> Edición. Editorial Interamericana. México. 497-520.
- 8.- García E. (1972). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Kopen. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 9.- Garner D.L.; Hafez E.S.E. (1985). Espermatozoide. En Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4ª Edición. Editorial - Interamericana. México. 181-193.
- 10.- Herrick J.B. y Seif H.L. (1965). Evaluación de la Fertilidad del Toro y del Verraco. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- 11.- Johnson L.A.; Aalbers J.G.; Willems C.M.T. and Readmarker J.H.M. (1980). Fertility of Boar Semen Stored in BL-1 and Kiev Extenders at 18°C for Three Days. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 6Th Congress. Copenhagen June 30th July 3rd. 33.
- 12.- Kerekgyarto S.C. (1977). Utilización del Semen Refrigerado en la - Producción Porcina. Porcrama Año VI No. 58 México. 45-49.
- 13.- Kutper C.U. and Hass A.J. de (1980). Some Aspects of Artificial Insemination in an Industrial Breeding and Production Program. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 6th Congress. Copenhagen. June 30th July 3rd. 36.
- 14.- Larsson K. and Darenius K. (1980). The fertility of AI Boars in Relation to Sperm Visibility After Dilution and Storage. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 6th Congress Copenhagen. June 30th July 3rd. 32.
- 15.- Larsson K. and Ersmar M. (1980). Laboratory Studies on Frozen Thawed Boar Semen in Relation to Contemporary Fertility whit - Liquid Semen of AI Boars. Zuchthygiene 15. 111-117.
- 16.- Peña V.M. y Melesio A.F. (1984). Comparación de la Motilidad Progresiva y Anormalidades de los Espermatozoides de Camero de la Raza Merino Australiano, Antes y Después de la Congelación en Pellets en tres Diferentes Diluentes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 17.- Peraza C. (1976). Ia Inseminación Artificial. en la Especie Porcina. Porcrama. XII Convención. Año V No. 49. México 4-11.
- 18.- Pérez G.T.; Vázquez G.I. y Martín R.S. (1978). Inseminación Artificial Porcina. Ponencia Presentada a las Jornadas Técnicas de INCOPORC-78. Lérida España. 3-11.
- 19.- Pursel V.G. (1978). Advances in Preservation of Swine Spermatozoa. In Beltsville Symposia in Agricultural Research 3. Animal Reproduction. May 14-17 1978. Beltsville Maryland U. S.A. 145-157.
- 20.- Pursel V.G. (1978). Artificial Insemination of Swine. Department of Animal Sciences. Swine Day Proceedings. Report No. 3 Washington U.S.A. 1-6.
- 21.- Salamon S.; Wilmut I. and Polge C. (1973). Deep Freezing of Boar Semen. I Effects of Diluent Composition, Protective Agents, and Method of Thawing on Survival of Spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 26. 219-230.
- 22.- Singleton W.L.; Esbenshade K.L.; Gerkin L.G.; Clegg E.D. and Jones H.W. (1977). Influence of Housing and Management on Growth and Reproductive Development of Young Boars. Swine Day. Purdue University. September 8, 1977. 33-39.
- 23.- Sorensen A.M. Jr. (1979). Animal Reproduction: Principles and Practices. 1th Edition. Mc Graw Hill Publications in the - Agricultural Sciences. U.S.A.
- 24.- Steel R.G.D. and Torrie J.H. (1980). Principles of Statics. A Biometrical Approach. Mc Graw Hill Inc. 2nd Edition.

- 25.- Visser D. and Salamon S. (1974). Effect of Composition of Tris-Based Diluent on Survival of Boar Spermatozoa Following Deep Freezing. *Aust. J. Biol. Sci.* 27. 485-497.
- 26.- White I.G. (1985). Secreción del Aparato Reprodutor Masculino y Plasma Seminal. En *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 4<sup>a</sup> Edición. Editorial Interamericana. México. 181-193.