

50
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio comparativo de tres diluyentes, para la conservación de semen refrigerado de verraco a nivel de campo.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

José Guadalupe Mercado Segura

ASESORES DE TESIS:

- M. V. Z. Arturo Angel Trejo Gonzalez
- M. V. Z. Marco Antonio Soto Flores



Cuautitlán Izcalli , Edo de México

1986



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.

I N D I C E

I	INTRODUCCION	1
II	OBJETIVOS e HIPOTESIS	9
III	MATERIAL y METODOS	10
IV	RESULTADOS	17
V	DISCUSION	25
VI	CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	27
VII	LITERATURA CITADA	28

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

En la actualidad la población porcina es una fuente importante de carne de abasto para la obtención de proteína de origen animal .

Debido a la crisis económica por la que atraviesa el país y a los elevados costos de producción , es necesario buscar sistemas de manejo óptimos para las explotaciones porcinas ; y de esta manera - la producción de carne de cerdo siga siendo rentable [25] . Esta -- rentabilidad en la producción de carne se basa principalmente en la capacidad y eficiencia reproductiva de sus animales , la utilización eficiente de los recursos humanos e instalaciones , así como la im_ - plementación de programas reproductivos , de alimentación , medicina preventiva , genética y de la comercialización de los animales [4] .

Para mantener la producción en una granja porcina de manera -- uniforme , es necesario que sus animales sean reemplazados en el mo_ - mento óptimo ; para lograr esto , se puede recurrir a la compra de - animales de otras granjas del país , a la compra de animales impor_ - tados o al establecimiento de un programa genético para la obtención de reemplazos de la misma granja . Actualmente la forma más costeable es la tercera , en la cual se puede hacer uso de la Inseminación Ar_ - tificial (I.A.) para facilitar los programas de cruzamientos y pa_ - ra introducir nuevas líneas genéticas .

A N T E C E D E N T E S

La inseminación artificial es la técnica mediante la cual es - depositado el semen de un macho en el aparato reproductor de una hem_ - bra , en el lugar adecuado para facilitar la fecundación por procedi_ - mientos mecánicos .

1.- Ventajas Zootécnicas

- a) Utilización al máximo de los reproductores de mayor calidad gené_ - tica .

- b) Aumento de la variabilidad genética de las granjas , incrementando la posibilidad de una selección racional de reproductores .
- c) Mayor rapidez para llevar a cabo pruebas de pro genie en los semen_ tales , al incrementarse el número de lechones producidos por año por semental .
- d) Facilidad de programación de cruzamientos entre varias razas para la obtención de híbridos comerciales .

2.- Ventajas Sanitarias

- a) Control de enfermedades infectocontagiosas y venereas .
- b) Evitar la entrada de pie de cria de otras granjas , potencialmen_ te portadores de enfermedades .

3.- Ventajas Economicas

- a) Mejora la eficiencia reproductiva y en el manejo
- b) Al utilizar verracos de mayor calidad genética , obtener mayor - producción de carne
- c) Ahorra espacio , alimentación e instalaciones , al disminuir el - número de verracos .
- d) Utilización al máximo de la mano de obra .
- e) Mayor uniformidad en los lotes de engorda .
- f) Permite la utilización de animales de distinto peso en los cruza_ mientos [13] .

4.- Desventajas

- a) El número de dosis reducidos obtenidos por cada eyaculado (10 a 20) incrementa los costos .
- b) Personal capacitado en la detección de calores y manejo del semen .
- c) Necesidad de un laboratorio y equipo para la aplicación y prepara_ ción del semen [1] .

Recientemente la I.A. ha atraído la atención de grandes y peque_ ños porcicultores . Partiendo de esta necesidad en México se han in _

tentado preservar el semen de cerdo a partir de los años 60's , adoptando técnicas similares de colección y dilución para bovinos , pero sin obtener resultados satisfactorios . De los diluyentes utilizados en bovinos y que posteriormente se empezaron a emplear en cerdos destacan los que contienen citrato de sodio , glicina , bicarbonato o soluciones glucosadas con o sin la adición de leche descremada y/o yema de huevo [6] .

El semen de cerdo puede ser conservado en estado líquido : fresco y diluido ; y en estado sólido : congelado [13] .

El semen diluido y conservado a temperatura de 15^o a 18^oC tiene un período de vida más prolongado que el semen fresco , entre 72 a 96 horas , y dependiendo de la concentración de espermatozoides por ml. pueden prepararse entre 15 y 20 dosis [9,15,18,19] .

El semen congelado es conservado a -196^oC y su tiempo de preservación es indefinido todavía .

Los diluyentes empleados para el semen deben reunir varias características como :

- 1.- Proporcionar nutrientes para mantener el metabolismo de los espermatozoides .
- 2.- Sustancias amortiguadoras para evitar cambios de pH bruscos .
- 3.- Sustancias crioprotectoras para evitar daños al espermatozoide cuando existan enfriamientos rápidos .
- 4.- Adecuada presión osmótica .
- 5.- Electrolitos adecuados y balanceados .
- 6.- Antibióticos para evitar crecimiento bacteriano .
- 7.- Proporcionar suficiente volumen para realizar múltiples inseminaciones [19] .

En Europa a partir de 1956 , se empezaron a ensayar exitosamente distintos procedimientos para la preservación a corto plazo del semen

de cerdo en estado líquido , a pesar de que uno de los mayores problemas que ha existido para difundir el uso de la I.A. en el cerdo ha sido la dificultad para mantener la motilidad y fertilidad del semen después de su dilución y almacenamiento [3] . En la década de los 60's se desarrollaron diluyentes efectivos que preservaron la capacidad fertilizadora del espermatozoide por varios días a temperatura de 15° a 18°C , sin embargo , los problemas que existen para mantener estas temperaturas durante el transporte del semen ha limitado el uso en estado líquido , aun en países que poseen sistemas eficientes de transporte [19] . En México se han realizado trabajos con semen diluido Sepulveda [21] en el cual se probó la fertilidad del semen de cerdo diluido con un diluyente comercial , obteniéndose una baja fertilidad , probablemente debido a la deficiente detección de calces y manejo del semen . Ramírez [20] comparó la fertilidad de dos diluyentes (Kiev y Taiwan) , encontrándose una mejor fertilidad y mayor tamaño de la camada para el diluyente Kiev .

Los diluyentes que han resultado ser más satisfactorios sobre la base de la preservación de la motilidad son aquellos que contienen glucosa y yema de huevo o leche , como la fuente principal de nutrientes [3,19] . Aamdal y Hoyset , citados por Graham y col., obtuvieron resultados satisfactorios con el semen diluido en amortiguadores a base de citrato . La leche descremada calentada a 92°C durante 5 minutos es mencionada entre los amortiguadores comunes en los programas de I.A. en los que el semen es utilizado el día de colección o al día siguiente [6] . Cheng citado por Koh y col., preparó un diluyente a base de leche descremada , glucosa , que es aplicado en forma rutinaria en Taiwan y Japon , y del que se ha obtenido resultados satisfactorios en cuanto a porcentaje de parición , para el que se obtuvo 79.9% empleando una concentración espermática de 5×10^9

por dosis de I.A. [20] .

Al parecer la mayoría de los diluyentes comunmente utilizados en la I.A. con semen preservado en estado líquido en el cerdo , es tan esencialmente basados en la glucosa con la adición de materiales amortiguadores como el citrato de sodio , bicarbonato de sodio ó la leche , algunas veces añadidos de proteínas provenientes de la yema de huevo o de la leche .

La temperatura de almacenamiento en estado líquido por lo general deberá estar por arriba de los 15°C [2,3,9] . Estudios realizados por Ito y col., citados por Dziuk y Pursel , indican que la temperatura óptima para almacenar el semen diluido es de 15° a 18°C [3,-20] . Mantener esta temperatura de almacenamiento es uno de los puntos más importantes en la preservación del semen . El almacenamiento del semen diluido por mas de 2 a 3 dias en los diluyentes Kiev y BL-1 y los que tengan como base la leche , reduce significativamente el porcentaje de parición y tiende a producir bajos números de lechones al parto [10] . La diferencia en los porcentajes de concepción y parición indican que los espermatozoides almacenados por más de 3 dias antes de la inseminación producen cigotos mucho más suceptibles a -- mortalidad embrionaria temprana [3] .

1.- Método de la diluyoconservación del semen en estado sólido (congelado) .

Existen dos formas principales para almacenar el semen congelado : a) en forma de pellets y b) en forma de pajillas o microtubos .

El congelamiento se basa en los siguientes lineamientos ; la -- fracción rica en espermatozoides es colectada dentro de una botella y mantenida ahí por dos horas a una temperatura de 22° a 24°C . El semen se centrifuga por 10 minutos a 300 gravedades . Una vez efectuado esto , el plasma seminal es eliminado por aspiración y la fracción resultante contiene una concentracion de 5×10^9 espermatozoides , la

cual se resuspende en un diluyente libre de glicerol . El semen con centrado se enfria gradualmente hasta 5°C por un periodo de dos ho_ ras , en un recipiente con agua destilada , se realiza de ésta forma para que el material fecundante no sufra cambios bruscos de tempera_ tura . Una vez que se haya enfriado este , se añade BF-5 (diluyente de Pursel y Jhonson) conteniendo 2% de glicerol (sustancia criopro_ tectora) para obtener una concentración final de 0.6×10^9 esperma_ tozoides por ml. , y 1% de glicerol . Esta adición del crioprotector se debe a que los espermatozoides comienzan a presentar daño acrosomal por abajo de temperaturas de 15°C [16] . Los espermatozoides se con gelan en pastillas con un volumen de 0.2 ml. , sobre hielo seco (tem_ peratura de -79°C) para despues conservarse y almacenarse en nitró_ trogeno líquido a una temperatura de -196°C en el termo .

2.- Método de la diluyoconservación del semen en estado líquido .

Despues de haberse efectuado la coleccion del semen , se realiza su evaluacion para saber la concentración espermática que posee . El diluyente que se vaya a utilizar debe haber sido preparado previamen_ te y fraccionado , toda vez hecha esta labor , se debe mantener con gelado y sólo hasta el momento que se vaya a utilizar se efectuará el descongelamiento , la dilución se realiza dejando resbalar suavemente por las paredes del frasco aplicador el semen , agregandolo al dilu_ yente . La temperatura que debe encontrarse tanto el semen como el - el diluyente al mezclarse , tendría que ser la misma , que deberá - estar entre los 28° y 34°C . Ya preparadas las muestras de semen di_ luído , son almacenadas a las temperaturas recomendadas para cada di_ luyente mismas que en general van de 15° a 20°C [1] .

El uso de semen refrigerado es el método mas económico para --- quienes desean utilizar un determinado semental para inseminar un - número pequeño de cerdas en un tiempo muy corto . El procesamiento del semen a 5°C , es similar , ya sea que se vaya a congelar o no .

Después de la colección debe mantenerse tibio (30°C) antes de diluirlo para evitar el choque frío [7] .

Pero en nuestro país estos métodos y técnicas se ven limitadas debido a los costos elevados del material que se requiere para la I.A. , al igual que la escasez del material requerido , por la falta de tecnología en nuestro país para su producción y mantenimiento del mismo . aunado a esto el manejo que le da el usuario al equipo . En México será prácticamente eficiente este método (I.A.) en los cerdos (y demás especies) cuando se mejoren las vías de comunicación y sistemas de distribución organizada . Aunque el problema más importante radica en la importación del termo y material para algunos diluyentes , así como el manejo que se le da a estos dos factores ; todo esto es debido a que en México no se ha podido crear una buena tecnología para la elaboración de los mismos instrumentos , así como la mala capacidad para elaborar material para diluyentes de buena calidad ; por lo cual el costo tan elevado de todo esto hace imposible que los pequeños porcicultores puedan aplicar esta técnica a un costo bajo o accesible . Por lo cual es necesario tratar de implementar otras técnicas de conservación de semen de verraco que no sea el semen congelado . Esto podría ser probando conservarlo diluido y refrigerado para que su uso sea un poco más accesible a los porcicultores .

No existe alguna razón que impida que la I.A. llegue a ser en el cerdo un procedimiento práctico y comercial . En la porcicultura nacional la I.A. si se llegara a lograr eficazmente la conservación de un semen fértil por largos periodos , favorecería el mejoramiento rápido de las razas porcinas , con bases zootécnicas adecuadas . La práctica de la I.A. como método de reproducción de las razas porcinas selectas permite eliminar cerdos de tipo graso por cerdos de tipo carne , para mejorar así , la economía del pequeño porcicultor ,

quien percibe mayores ingresos con la mínima inversión por concepto de animales de máxima calidad , cuya obtención , en ocasiones es - costoso y difícil .

O B J E T I V O

El objetivo de este trabajo es determinar si el método de conservación de semen diluido refrigerado mantiene un porcentaje de fertilidad adecuado y es a su vez económicamente rentable para los pequeños porcicultores .

H I P O T E S I S

Al utilizar algunos componentes para evitar el daño por enfriamiento , es muy probable que se prolongue el tiempo de conservación del semen diluido refrigerado con buenas cualidades .

Esto debido a que entre menos cambios sufra el espermatozoide al bajar su temperatura a menos de 15°C , el tiempo de viabilidad puede ser mayor .

M A T E R I A L Y M E T O D O S
L O C A L I Z A C I O N

1a. FASE

Esta fase experimental se llevó a cabo en la granja San Francisco , de ciclo completo , esta se encuentra ubicada en los lindes del municipio de Cuautitlán de Romero Rubio , en el pueblo de Teoloyucan , Edo. de México , al norte de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México . Su localización geográfica es a los $19^{\circ}45'$ de latitud norte y a los $99^{\circ}11'$ de longitud oeste del Meridiano de Greenwich , a una altura sobre el nivel del mar de 2285 [5] .

2a. FASE

La fase experimental se terminó en la Granja Experimental Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México , que se encuentra ubicada en la parte sureste del Valle de México , a la altura del kilómetro - 21.5 de la calzada México-Tulyehualco , en la calle Manuel M. López s/n , dentro del perímetro del pueblo de Zapotitlán , Delegación de Tlahuac , D.F.. Su localización geográfica es a los $19^{\circ}18'$ latitud norte y a los $99^{\circ}2'30''$ de longitud oeste del Meridiano de Greenwich a una altura sobre el nivel del mar de 2242 metros con una presión de 558 mg. de Hg. [5] .

A N I M A L E S E X P E R I M E N T A L E S

1a. FASE

Se utilizaron tres sementales , los cuales fuéron colectados dos veces por semana hasta obtener cinco muestras por cada animal .

2a. FASE

a) Se utilizaron dos sementales del programa de Inseminación Artificial .

b) También se ocuparon dos verracos , uno criptorquídeo y otro vasec-tomizado , para la estimulación de las gónadas con hormonas y detec-

cion de calores .

- c) Se utilizaron 30 cerdas primerizas de 4 a 5 meses de edad híbridas seleccionadas del área de desarrollo ; estas fueron estimuladas dos veces al día , con los machos rotatoriamente , una hora - cada sesión , ésto para estimular la aparición del calor temprano , este estímulo se empezó a hacer a partir de los 155 días de edad de las hembras [11] , al llegar a un peso de 90 Kg. y presentar su primer calor fueron distribuidas en tres grupos de 10 hembras cada uno . Estas hembras fueron alimentadas racionadamente desde los 155 días de edad hasta ir al rastro , dandoles una ración de alimento de tipo comercial concentrado finalizador de dos kilos por cada una .

G R U P O S E X P E R I M E N T A L E S

1a. FASE

De cada semental se obtuvieron cinco eyaculados , cada eyaculado era diluido en los tres diferentes diluyentes (Cuadro 1) .

Cuadro 1 Programa de distribución del semen a los diferentes tratamientos .

Semental #					
# de muestra	1	2	3	4	5
D TRIS-YEMA DE					
I HUEVO					
L					
U BICARBONATO-YE					
Y MA DE HUEVO					
E					
N					
T LECHE DESCREMA					
E DA					
S					

2a. FASE

- a) Se formaron tres grupos de 10 cerdas cada uno que fueron subdivididos a su vez en lotes de cinco hembras cada uno , para realizar la I.A. con tres diferentes diluyentes (*) , a dos tiempos dife-

rentes de conservacion del semen diluido para cada uno de los - grupos (Cuadro 2) .

b) Los verracos que estimulaban a las cerdas éran usados alternada- mente para evitar que las hembras se acostumbraran a un solo ma- cho .

c) La colección de los sementales se hacía cada 6 o 7 días .

(*) DILUYENTES

A) TRIS-YEMA DE HUEVO

TRIS	12 (g)
Glucosa	32 (g)
Ac. Cítrico	8 (g)
Yema de huevo	200 (ml)
Penicilina	1000 (U.I./ml)
Estreptomocina	1000 (μ g/ml)
Agua destilada c.b.p.	1000 (ml)

B) BICARBONATO-YEMA DE HUEVO

Bicarbonato de sodio	1.5 (g)
Glucosa	30 (g)
Yema de huevo	300 (ml)
Penicilina	1000 (U.I./ml)
Estreptomocina	1000 (μ g/ml)
Agua destilada c.b.p.	1000 (ml)

C) LECHE DESCREMADA

Leche descremada	100 (g)
Penicilina	1000 (U.I./ml)
Estreptomocina	1000 (μ g/ml)
Agua destilada c.b.p.	1000 (ml)

La leche se calienta a 92°C por 10 minutos antes de adi_

cionarle los antibioticos .

Cuadro 2 Programa de distribucion de las hembras a los diferentes tratamientos en dos tiempos distintos de servicio prees-
tablecidos .

Grupo 1	TRIS-Yema de huevo	Subgrupo 1 = 24 hrs. I.A.
		Subgrupo 1a= 48 hrs. I.A.
Grupo 2	Bicarbonato-Yema de huevo	Subgrupo 2 = 24 hrs. I.A.
		Subgrupo 2a= 48 hrs. I.A.
Grupo 3	Leche descremada	Subgrupo 3 = 24 hrs. I.A.
		Subgrupo 3a= 48 hrs. I.A.

P R O C E D I M I E N T O E X P E R I M E N T

1a. FASE

El verraco era sacado de su corral y llevado al área de montas en el cual se introducía una hembra en calor para que fuera montada por el verraco , al momento de hacerlo se vaciaba el divertículo -- prepucial , con el fin de evitar la contaminación de las muestras - a obtener por el escurrimiento de orina que ahí se concentra , des-
pues el animal desenvainaba y en ese momento era tomado el glande - con la mano haciendole cierta presión para evitar que el animal re-
trajera el pene , posteriormente se hacían contracciones con la mano para simular las contracciones cervicales , el semen se colectó en un termo preparado para el mismo fin , como el semen se iba a diluir se colectó unicamente la porción rica del eyaculado .

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación del semen , la -- cual consistió en : a) Observación de la motilidad al microscopio - óptico colocando una gota del semen en un portaobjetos , cubriendo-
lo con un cubreobjetos , los cuales éran mantenidos a una temperatu-
ra de 35° a 37°C por medio de una termoplatina ; b) Observación de la morfología espermática : se llevó a cabo realizando un frotis con la tinción de Wells-Awa , para posteriormente hacer un conteo de 200 es-

permatozoides, y así obtener el porcentaje de anormalidades .

Previamente a todo ésto los diluyentes ya se habían preparado y guardado en refrigeración , éstos eran puestos en baño María , de tal manera que tuvieran una temperatura de 30° a 35°C para poder ser ocupados . El diluyente tenía que estar a la temperatura que se encontrara el semen y la dilución se hizo en una proporción de 1:5(v/v) o sea 1 parte de semen por 4 partes de diluyente . La conservación del semen diluido se hizo a una temperatura de 5°C en un refrigerador , a las 24 h siguientes a su preparación el semen se sacó del refrigerador y se puso en baño María una fracción en un tubo de ensaye a una temperatura de 37°C durante 30 minutos , haciendose la - evaluación de motilidad y porcentaje de anormalidades , esto último se hacía cada 24 h y se dejaba de hacer cuando se observaba una motilidad inferior a 15% .

2a. FASE

a) El semental era sacado de su corral y llevado al potro de montas donde se hacía la misma técnica que a los animales de la 1a. fase para la colección y evaluación del semen , solo que a estas muestras se les realizaron dos pruebas más : I) Concentración espermatológica por medio de la técnica del hematocitómetro , aplicando la siguiente formula :

Concentración ml=[# de espermatozoides x 1/5 x 1/10 x 1/200][1000]

para obtener el total de espermatozoides por ml.; II) Morfología - acrosomal : se obtenía una pequeña muestra de las dosis que se iban a utilizar para la I.A. de ese día , se hizo antes de ser puestas en baño María , de las dosis se tomó una gota y se puso en un tubo de ensaye agregandole después 3 ml de solución de Hancock [8] , estas eran observadas al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 20 x 25x y aceite de inmersión , se hizo el conteo de 200 espermatozoides por cada muestra , para sacar el porcentaje de acrosomas

normales [15,16,17] .

Cada dosis de inseminación contuvo un volumen final de 80 ml , en los cuales hubo una concentración de 5×10^9 espermatozoides , estas dosis se preparaban 24 y 48 h pre-servicio (tiempo establecido por los resultados de la 1a. fase) , su conservación era igual que para los de la 1a. fase , asi como el procedimiento para su utilización era el mismo que para la evaluación ; al terminar de hacer las evaluaciones correspondientes se inseminaban las cerdas que se requerían , el tipo de cateter que se utilizó fué el desarrollado por Melrose .

b) A las hembras se les revisaron los primeros calores , esto se hizo con un macho vasectomizado y el criptorquídeo , llevando a estas ala saurda de las cerdas dos veces al dia , una a las 8 o 9 a.m. y laotra a las 5 o 6 p.m.; Al segundo calor también se detectó y estimuló con los machos mencionados anteriormente , se inseminó de la siguiente manera : Si la cerda entraba en calor en la mañana del dia 1 , la 1er. I.A. se hizo en la tarde del dia 1 y la 2a. I.A. en la mañana del dia 2 . Si la marrana entraba en calor en la tarde del dia 1 se hizo la 1a. I.A. en la mañana del dia 2 y la 2a. I.A. en la tarde del dia 2 .

Dependiendo del número de hembras que entraban en calor se hizo la distribución en los grupos experimentales de los diluyentes a utilizar .

A los 30 dias post-I.A. se hizo el diagnóstico de gestación con la técnica de ultrasonido , y luego fueron enviadas a rastro (Cua - dro 12) . No se pudieron recuperar los úteros para realizar el conteo de embriones , ya que no fué permitido por los propietarios de las canales y visceras .

A N A L I S I S E S T A D I S T I C O

1a. FASE

Se hizo por medio del analisis de varianza , con transformacion al arcoseno y utilizando la prueba de rango multiple de Duncan [22] .

R E S U L T A D O S

En el cuadro 3 podemos observar el análisis de varianza de la motilidad progresiva en donde se ve que la interacción entre el diluyente y el tiempo (D x T) tiene una diferencia significativa de $P \angle 0.01$. El cuadro 4 nos detalla más los resultados anteriores en donde el semen fresco tiene una diferencia significativa de $P \angle 0.05$ en comparación del semen diluido refrigerado en los tres distintos tratamientos . A las 24 h los tres diluyentes no presentan diferencia significativa , aunque el diluyente de leche descremada presenta una ligera ventaja sobre el TRIS y una más amplia sobre el de bicarbonato pero no significativa (Cuadro 4) . A las 48 h el diluyente TRIS presenta una pequeña ventaja no significativa sobre el de leche descremada , pero si una diferencia significativa de $P \angle 0.05$ sobre el de bicarbonato (Cuadro 4) . A las 72 h los tres diluyentes -- presentan una diferencia significativa de $P \angle 0.05$, mostrando el TRIS una ventaja sobre el bicarbonato y más amplia sobre el de leche. De las 96 h en adelante ya no hay diferencia .

El cuadro 5 se refiere al análisis de varianza de la recuperación de motilidad , en donde vemos que para la interacción D x T no hay diferencia significativa , sino lo que influye en los tratamientos es el factor tiempo , el cual tiene una diferencia significativa de $P \angle 0.01$. El cuadro 6 nos muestra que la recuperación de motilidad a las 24 h para los tres diluyentes no presenta diferencia significativa , aunque la leche presenta una ventaja sobre el de TRIS y el de bicarbonato . A las 48 h los tres tratamientos no muestran diferencia significativa , aunque los tratamientos de leche y bicarbonato si muestran diferencia significativa de $P \angle 0.05$ en cada uno de ellos con respecto a las 24 h , el TRIS no muestra diferencia significativa a ningún tiempo y a las 72 h los tres diluyentes no vuelven a mostrar diferencia significativa .

El cuadro 7 se refiere al análisis de varianza de las anomalías primarias , en donde se puede observar que la interacción D x T tiene una diferencia significativa de $P \leq 0.01$. En el cuadro 8 se desglosan los resultados del cuadro 7 . En donde el semen fresco no presenta ninguna diferencia significativa con respecto con el diluyente TRIS , una mejor tendencia pero no significativa con respecto a la leche descremada hasta las 72 h en donde la diferencia significativa es de $P \leq 0.05$ y con el bicarbonato es igual que al anterior con la diferencia significativa de $P \leq 0.05$.

El cuadro 9 se refiere al análisis de varianza de las anomalías secundarias , en donde se observa que no hay diferencia significativa en el factor tratamientos ni en el factor D x T , mostrando esto el cuadro 10 .

En cuanto al factor de los machos aun cuando hubo diferencia significativa , no se tomó en cuenta , debido a que los animales - despues de concluida la 1a. fase fueron castrados para poder ser enviados al rastro .

Cuadro 11 nos muestra los porcentajes de la morfología acrosomal de cada una de las muestras de los tres diferentes grupos experimentales , donde se puede ver que el porcentaje de normales y anormales es el aceptado para esta especie [16] . Aunque no es muy representativa la cantidad de muestras que pudieron ser evaluadas ; esto fue debido a que nos encontramos con algunos problemas en la preparación de los diluyentes , que se analizan en la discusión .

En el cuadro 12 se observa los porcentajes de fertilidad que se obtuvieron en cada uno de los grupos experimentales , en donde vemos que estos fueron negativos debido a varias circunstancias las cuales discutiremos posteriormente .

CUADRO 3 ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA EN SEMEN DE VERRACO FRESCO Y REFRIGERADO EN TRES DILUYENTES HASTA 96 HORAS .

Fuentes de variación	G. L.	S. cuadrados	C. M.	F	Sig.
TOTAL	121	38229.25	315.94	----	----
Tratamientos	14	24820.78	1772.91	15.80	0.01
Bloques=Machos	2	1643.49	821.74	17.30	0.01
Diluyentes	3	7605.29	2535.09	22.60	0.01
Tiempo	5	10578.85	2115.77	18.80	0.01
D x T	15	6636.64	442.44	3.9	0.01
Error	105	11764.98	112.04	----	----

G.L. * Grados de libertad S. cuadrados = Suma de cuadrados

C.M. = Cuadrados medios Sig. = Significancia

CUADRO 4 MOTILIDAD PROGRESIVA

Diluyentes	Machos	Fresco	24horas	48horas	72horas	96horas
TRIS-Yema de huevo	3	79.33±2.51 ^a	39.91±4.61 ^{bd}	25.55±2.54 ^{bde}	14.44±2.54 ^{ec}	9.33±1.15 ^c
Bicarbonato-Yema de huevo	3	-----	34.41±18.96 ^b	15.5 ±19.61 ^c	11.20± 0 ^c	5.00± 0 ^c
Leche descremada	3	-----	44.95±11.12 ^b	20 ± 5 ^{dc}	6.5 ±3.27 ^c	7.50±3.53 ^c

Letras diferentes representan diferencias significativas " Duncan P / 0.05 " .

CUADRO 5 ANALISIS DE VARIANZA PARA LA RECUPERACION DE MOTILIDAD EN SEMEN DE VERRACO FRESCO Y REFRIGERADO EN TRES DILUYENTES HASTA 96 HORAS .

Fuentes de variación	G. L.	S. cuadrados	C. M.	F	SIG.
TOTAL	106	33174.68	312.96	-----	----
Tratamientos	13	11609.84	893.06	3.90	0.01
Blocues=Machos	2	744.25	372.12	1.62	n.s.
Diluyentes	2	307.86	153.93	.672	n.s.
Tiempo	4	10948.23	2737.05	11.96	0.01
D x T	8	353.75	44.21	.193	n.s.
Error	91	20820.54	228.79	-----	----

G.L. = Grados de libertad S. cuadrados = Suma de cuadrados
 C.M. = Cuadrados medios SIG = Significancia

CUADRO 6 MOTILIDAD PROGRESIVA

Diluyentes	Machos	Fresco	24horas	48horas	72horas	96horas
TRIS-Yema de huevo	3	-----	48.51 _{ad} ⁺⁸¹	30.88 _{bcd} ^{+3.18}	17.62 _{bf} ^{+2.46}	11.08 _{bcd} ^{+0.938}
Bicarbonato-Yema de huevo	3	-----	43.37 _{ac} ^{+25.18}	19.90 _{bg} ^{+25.43}	14.43 _b ⁺⁰	7.14 _{acdefgh} ⁺⁰
Leche descremada	3	-----	58.28 _a ^{+14.02}	26.29 _{be} ^{+6.95}	8.95 _{bd} ^{+5.04}	10.51 _{bcd} ^{+3.98}

Letras diferentes representan diferencias significativas " Duncan P / 0.05 "

CUADRO 7 ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS ANORMALIDADES PRIMARIAS EN SEMEN DE VERRACO FRESCO Y REFRIGERADO EN TRES DILUYENTES HASTA 96 HORAS .

Fuentes de variación	G. L.	S. Cuadrados	C. M.	F	SIG.
TOTAL	70	1269.82	18.14	-----	----
Tratamientos	12	345.96	28.83	12.26	0.01
Bloques=Machos	2	791.73	395.86	168.45	0.01
Diluyentes	3	125.83	41.94	17.84	0.01
Tiempo	5	73.70	14.74	6.27	0.01
D x T	15	146.43	9.76	4.15	0.01
Error	56	132.13	2.35	-----	----

o

G.L. = Grados de libertad S. Cuadrados = Suma de cuadrados
C.M. = Cuadrados medios SIG. = Significancia

CUADRO 8 ANORMALIDADES PRIMARIAS

Diluyentes	Machos	Fresco	24horas	48horas	72horas	96horas
TRIS_Yema de huevo	3	4.0 _{ab} +2.46	5.83 _{ab} +4.48	5.38 _{ab} +2.93	3.16 _a +1.15	3.33 _{ab} +1.52
Bicarbonato-Yema de huevo	3	-----	5.25 _{ab} +2.61	4.33 _{ab} +4.66	10.50 _c + 0	-----
Leche descremada	3	-----	7.16 _{bc} +2.20	5.50 _{ab} +2.12	8 _{ac} +7.07	-----

Letras diferentes representan diferencias significativas " Duncan P / 0.05 "

CUADRO 9 ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS ANORMALIDADES SECUNDARIAS EN SEMEN DE VERRACO FRESCO Y REFRIGERADO EN TRES DILUYENTES HASTA 96 HORAS .

Fuentes de variación	G. L.	S. Cuadrados	C. M.	F	SIG.
TOTAL	67	3003.89	44.83	-----	----
Tratamientos	12	447.07	37.25	.883	n.s.
Bloques=Machos	2	334.18	167.09	3.98	0.01
Diluyentes	3	265.47	88.49	2.11	0.01
Tiempo	5	101.92	20.38	.283	n.s.
D x T	15	79.68	5.31	.126	n.s.
Error	53	222.64	41.93	-----	----

G.L. = Grados de libertad

S. Cuadrados = Suma de Cuadrados

C.M. = Cuadrados medios

SIG. = Significancia

CUADRO 10 ANORMALIDADES SECUNDARIAS

Diluyentes	Machos	Fresco	24horas	48horas	72horas	96horas
TRIS-Yema de huevo	3	3.75 \pm 2.47	4.75 \pm 1.06	1.95 \pm .586	2.75 \pm 1.06	4 \pm 1.41
Bicarbonato-Yema de huevo	3	-----	4.50 \pm 3.18	10.66 \pm 0	5.75 \pm 0	-----
Leche descremada	3	-----	3 \pm 1.41	6.66 \pm 0	13 \pm 0	-----

Letras diferentes representan diferencias significativas " Duncan P / 0.05 "

CUADRO 11. PORCENTAJE DE MORFOLOGIA ACROSOMAL PARA SEMEN DE VERRACO
REFRIGERADO EN TRES DILUYENTES Y ALMACENADO HASTA 48 HORAS .

Grupo	Diluyentes	Horas	No. de muestras evaluadas	Porcentaje de acrosomas normales (%)	Porcentaje de acro- somas anormales (%)
1	TRIS-Yema de huevo	24	1	97± 0	3± 0
		36	1	97+ 0	3± 0
		48	0	-----	-----
2	Bicarbonato-Yema de huevo	24	0	-----	-----
		36	0	-----	-----
		48	0	-----	-----
3	Leche descremada	24	4	95.5±1.73	4.5±1.73
		36	2	96.5± 0	3.5+ 0
		48	1	96 ±	3.8± 0

El número reducido de muestras evaluadas se debió a que del total de muestras , no fue posible su evaluación , debido a la alta concentración y aglutinación que presentaron , por lo tanto no se hizo analisis estadístico .

CUADRO 12 PORCENTAJE DE FERTILIDAD PARA SEMEN DE VERRACO REFRIGERADO EN TRES
DILUYENTES Y ALMACENADO HASTA 48 HORAS .

Grupo	Diluyentes	Subgrupo	No. animales inseminados	Porcentaje de fertilidad (%)	No. de embriones
1	TRIS-Yema de huevo	1 24 h	5	0	0
		1a 48 h	5	0	0
2	Bicarbonato-Yema de huevo	2 24 h	5	20	7*
		2a 48 h	5	0	0
3	Leche descremada	3 24 h	5	20	7*
		3a 48 h	5	0	0

(*) Este número de embriones fueron de las únicas cerdas que quedáron gestantes ,
solamente que no se supo si fueron el total de ellos , ya que la hembra abortó en la
madrugada , aproximadamente a los 75 dias de gestacion .

D I S C U S I O N

En la 1a. fase , durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (5°C) del semen diluido , se observó que el tiempo de -- preservación fue mayor para el diluyente que contiene TRIS , conservando buenas cualidades del semen en comparación con los otros dos -- diluyentes a las 72 h . Aunque se observó que el tiempo óptimo para su utilización es a las 48 h como máximo .

Esto no coincide con lo reportado por Kato y col. [10] , quienes encontraron características aceptables hasta los 12 días , sin embargo los diluyentes , aunque con la misma base , no fueron preparados de igual forma ; retirandose en este caso algunos componentes que en carecen la mezcla , y omitiendose algunas técnicas en su preparación , como fué la centrifugación al final de haberse hecho la mezcla , lo -- cual pudo haber afectado , como se dijo en la apreciación de la morfología acrosomal , esta omisión se debió a que la mezcla se haría a -- nivel de campo y no se podría llevar a cabo esta técnica ; Pursel[19] menciona que la composición de la yema de huevo , si no se centrifuga afecta al semen . Niwa y col. [14] también mencionan buenos resultados de almacenamiento a temperaturas de 3° a 5°C con el diluyente a base de TRIS .

En la 2a. fase a nivel de laboratorio y de campo , se observó -- que el diluyente a base de leche descremada tiene buenas cualidades junto con el diluyente a base de TRIS hasta las 24 h . Esto coincide con los datos de Aamdal y Huyset citados por Graham y col. [6] quienes utilizaron la leche con resultados aceptables durante 24 h .

Con los resultados obtenidos en la 2a. fase , no se pudo definir la situación de que diluyente se comportaría mejor de los tres utilizados , esto debido a que la prueba de campo se vió afectada -- por varios factores :

- a).- El usar hembras primerizas

- b).- No haber hecho las técnicas completas en la preparación de los diluyentes .
- c).- Un brote de Parvovirus que afectó a la granja ; el cual -- afecta en etapas tempranas de la gestación en la mayoría - de las veces evitando la implantación de embriones [12] .
- d).- Las cerdas que tenían de 15 a 30 días de servidas con I.A. sufrieron un stress durante 4 días , debido a que los co_rrales en los que se encontraban fueron despojados de sus - techos para algunas reparaciones , por lo tanto estuvieron a merced de los rayos solares , lo que les provocó una ele_vación de su temperatura a 39.5° y 40° C , durante 5 días .

C O N C L U S I O N E S

Con respecto a las evaluaciones hechas en los cuadros 4 y 6 los tres diluyentes no pueden ser utilizados para la I.A. de las 72 h en adelante .

También con esto se observa que el mejor de los tres diluyentes fué el que contiene TRIS , pero a nivel de campo y por los resultados presentados en los cuadros 4 , 6 , 11 y 12 , es más económico y accesible la preparación y utilización del diluyente a base de leche descremada durante las primeras 48 h de preparado .

R E C O M E N D A C I O N E S

Se recomienda realizar más trabajos de investigación sobre ésta línea , utilizando un mayor número de hembras en edad adecuada y --- buscar alternativas en los componentes de los diluyentes para que mejoren su calidad y puedan ser preparados en condiciones de campo .

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1.- BUSTOS,F.J.M. : Sistema de capacitación en Inseminación Artificial en Porcinos . Tesis de Licenciatura de la Fac.Med.Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México , México , D.F. 1984 .
- 2.- DU MESNIL DU BUISSON and SIGNORET,J.P. : Reproductive physiology and artificial insemination in pig . Vet.Rec. 87 : 562-568 1970 .
- 3.- DZIUK,P.J. : Dilución and storage of boar semen . J. Anim.Sci. 17 : 548-553 (1958) .
- 4.- GALLINA,A.L.: Contribución al estudio de la inducción y sincronización del estro en cerdas primerizas híbridas con un componente a base de PMSG y HCG . Tesis de Licenciatura de la Fac.Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México , - México , D.F. 1980 .
- 5.- GARCIA,E. : Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopën , Universidad Nacional Autónoma de México . 1973 .
- 6.- GRAHAM,E.F.,CRABO,B.G. and PACE,M.M. : Current status of semen preservation in the ram and stallion . J.Anim.Sci.(suppl. 11) 47 : 80-119 (1978) .
- 7.- HAFEZ,E.S.E. : Reproduction in farm animals. 4a. ed. Ed. Lea & Febiger Philadelphia U.S.A. 1980 .
- 8.- HANCOCK,J.L. : The morphology of boar spermatozoa . J. Rol.Soc. 76 : 846(1959) .
- 9.- JOHNSON,L.A.,AALBERG,J.G. : Use of boar spermatozoa for artificial insemination : III Fertility of boar semen stored in BL-1 Kiev extenders at 18°C for three days . J.Anim.Sci. 54 : 132-136 1982 .
- 10.- KATO,S., SAIDA , and TERAYAMA,K. : Successful pregnancy usin boar

- spermatozoa stored at 4°C for 12 days. Japanese J. Anim.Reproduc. 25. : 48-49 (1979) . In Pig News and Information 2 72 (1981) .
- 11.- KIRKWOOD,R.N.,HUGHES,P.I. : Puberty in the gilt-role of boar stimulation . Commonwealth Agricultural Buseaux 1982 in Pig News and Information 3 : 389-394 (1982) .
 - 12.- LEMAN,A.D. : Diseases of swine . 5a. ed Ed. Iowa State University Press Ames . Iowa , U.S.A. (1981) .
 - 13.- NECOCHEA,R.R.,AGIADÉ,P.C. : Diagnóstico de las enfermedades del cer5do . Ed. Necochea,R.R.,Agiade,P.C. (1982) .
 - 14.- NIWA,T.,HASHIZUME,T. : Studies on the storage of boar semen at - 5°C . I Effect on sperm viability of semen diluent additives and rate of temperature changes . Bulletin of the Laboratory of Artificial Insemination , Iwate University 3 : 31-38 (1982) in Pig News and Information 1 : 63 (1984) .
 - 15.- PURSEL,V.G.,JOHNSON,J.A. : Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock . J.Anim.Sci. 34 : 278-283 (1972) .
 - 16.- PURSEL,V.G.,SHULMAN,L.L. and JOHNSON,L.A. : Effect of holding - time on storage of boar spermatozoa at 5°C . J.Anim.Sci. 37 : 785-789 (1973) .
 - 17.- PURSEL,V.G.,JOHNSON,J.A. : Glutraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation . J.Anim.Sci. 1 : 63-68 (1974) .
 - 18.- PURSEL,V.G.,JOHNSON,J.A. : Freezing of boar spermatozoa : Fertilizing capaciting with concentrated semen and a new thawing -- procedure . J.AnimSci. 40 : 99-102 (1975) .
 - 19.- PURSEL,V.G. : Advances in preservation of swine spermatozoa . - p. 145-158 . In : Beltsville symposia in Agricultural Reserch . Animal Reproduction . Allenheld , Osmun and Co.,Montclair , - New Jersey . (1979) .
 - 20.- RAMIREZ,R.R.A. : Evaluación de dos diluyentes para preservar el

semen de cerdo en estado líquido . Tesis de Licenciatura de la Fac.Med.Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México , México , D.F. 1984 .

- 21.- SEPULVEDA,G.L.A. : Establecimiento de un sistema de Inseminación Artificial en una granja porcina de tipo comercial utilizando semen fresco diluido . Tesis de Licenciatura de la Fac.Med.Vet de la Universidad Nacional Autonoma de Nuevo Leon . 1980 .
- 22.- STELL,R.G.D. & TORRIE,J.H. : Statical Procedures A Biometrical Approach Ed. Mc.Graw Hill 1980 .
- 23.- VIDAURRAZAGA,O.J.L. : Inducción del parto en cerdas con el uso de prostaglandinas y su análisis económico ,Tesis de Licenciatura de la Fac.Med.Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México , México,D.F. 1984 .