

231
2ij



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia*

**MOTILIDAD Y DAÑO ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE
CERDO ALMACENADOS EN LOS DILUYENTES BB Y BTS
DURANTE SIETE DIAS**

T E S I S
*Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista
presenta*

JOSE LUIS TINOCO JARAMILLO



*Asesores: M.V.Z. Joaquín Becerril Angeles
M.V.Z. Ricardo Navarro Fierro*

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



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

	Pags.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Material y Métodos.....	6
a)Localización del Centro de IA.....	6
b)Animales Experimentales.....	6
c)Procedimiento Experimental.....	7
d)Análisis Experimental.....	9
Resultados.....	10
Discusión.....	19
Literatura Citada.....	23

RESUMEN

José Luis Tinoco Jaramillo: "Motilidad y daño acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en los diluentes BB y BTS durante siete días", bajo la asesoría de los MVZ. Joaquín Becerril Angeles y Ricardo Navarro Fierro.

Se evaluó la motilidad y el daño acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en los diluentes BB y BTS a lo largo de una semana. Se prepararon muestras con el eyaculado de un solo semental o con la mezcla de eyaculados de varios sementales. Una fracción de cada muestra se diluyó en BB y otra en BTS, todas contenían una concentración espermática de 5×10^7 y se evaluaron a las 0, 24, 72, 120, 168 h. Se usaron 18 muestras. La motilidad varió significativamente con el tiempo de almacenaje ($P < 0.01$) siendo la caída en la motilidad más temprana con el semen diluido en BTS que en el diluido en BB. La proporción de acrosomas normales fué distinta entre diluentes y tuvo una reducción significativa con el tiempo ($P < 0.01$); la tendencia a lo largo del tiempo fué similar entre diluentes ($P > 0.05$). El porcentaje de acrosomas dañados no mostró efecto significativo en ninguno de los factores analizados ($P > 0.05$). La proporción de acrosomas perdidos fué mayor en BTS ($P < 0.05$) y aumentó con el tiempo significativamente ($P < 0.01$) con tendencias similares. La proporción de acrosomas degenerados aumentó significativamente con el tiempo ($P < 0.05$) pero no fué distinto entre diluentes, ni entre tipo de semen ($P > 0.05$). La variabilidad de los resultados fue menor cuando la muestra era de la mezcla de varios eyaculados. Se concluye que el diluyente BB es mejor opción que el diluyente BTS, por conservar de mejor manera las condiciones fisiológicas de los espermatozoides de cerdo en lo que se refiere a la motilidad y morfología espermática.

INTRODUCCION.

Día con día se hace más necesaria la búsqueda de nuevas técnicas para que los sistemas de explotación de los animales domésticos sean lo más eficientemente posibles; permitiendo a los productores satisfacer de manera óptima las necesidades de los consumidores de productos de origen animal.

El manejo reproductivo del verraco, dentro de las empresas porcícolas es de suma importancia, ya que los progresos genéticos que se tengan se deben en gran parte al semental, debido a que éste proporciona de 15 a 20 veces más crías que cualquier hembra. Con el uso de la inseminación artificial (IA) la eficiencia productiva de los cerdos se ve ampliamente favorecida: de cada verraco se obtiene semen suficiente para servir centenares de hembras (1,3,6,7,10,11,12,17,18,31).

Las ventajas de usar la IA son: a) mejoramiento genético acelerado mediante el uso de sementales probados; b) mejora la utilización del semental; c) evita la transmisión de enfermedades venéreas; d) facilita el transporte y distribución del semen; e) disminuye las necesidades de machos en la piara y por lo tanto los gastos de manutención que representan; f) estimula el uso de registros de producción; g) facilita la implementación de programas de sincronización de estros; h) posibilita la adquisición de dosis de animales valiosos por parte de porcicultores de escasos recursos económicos y, i) permite la realización de

un mayor número de pruebas de progenie (11,18).

Sin embargo la IA también tiene desventajas: una de ellas es el rápido deterioro de los espermatozoides en diluentes para mantener la fertilidad en estado líquido; las alteraciones ocurren en la motilidad y la morfología acrosomal de los espermatozoides y se incrementan con el tiempo de almacenaje (5,12).

El semen de cerdo puede preservarse de dos maneras: en estado líquido o en congelación. La mayoría de los diluentes líquidos lo conservan de dos a tres días. En congelación, si el diluyente satisface las necesidades metabólicas y de crioprotección de los espermatozoides dura indefinidamente (5,14,21,25,28).

Los diluentes que más se usan para preservación del semen en estado líquido son: Beltsville Thawing Solution (BTS), Beltsville Liquid Extender (BL-1), Kiev (Guelph), Illinois Variable Temperature (IVT), SCK-7, Milk Extender, Zorlesco y Modena. Se ha encontrado que el diluyente BTS mantiene mejor la capacidad fertilizante y la integridad morfológica de los espermatozoides, aunque sólo lo logra por periodos de tres a cuatro días (2,5,8,9,16,24,25).

Aalbers *et al* (3) compararon la fecundidad del semen de cerdo diluido y almacenado en los diluentes BTS, Kiev, Zorlesco y Modena a 18°C, utilizando dosis con una concentración de tres mil millones de espermatozoides por ml

y aplicadas en diferentes granjas al tercer día de colección. encontraron porcentajes de pariciones que variaron de 59 a 100% con BTS, 47 a 87% con Kiev, 50 a 73% con Zorlesco y de 49 a 74% con Modena.

Por otra parte Pursel (24), comparó los diluentes BTS, BL-1, Kiev y Modena a temperaturas diferentes (15, 19, 23°C) y durante siete días de almacenamiento. Utilizó dosis que contenían cuarenta millones de espermatozoides por ml; encontró que el porcentaje de la motilidad progresiva del semen almacenado en BTS fué superior que el semen almacenado en otros diluentes. Además señala que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal fué similar en BTS y Kiev y que éstos disminuyeron significativamente en los diluentes BL-1 y Modena.

En otro experimento Aalbers et al (4) utilizaron semen diluido en BTS y lo almacenaron a 16-18°C por periodos de 2 a 10, 20 a 28, 26 a 34 y 44 a 52 h observando que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal disminuía significativamente con el tiempo. Además señala que el porcentaje de pariciones fué significativamente superior en el semen almacenado de 20 a 28 h, que en el almacenado de 44 a 52 h (82.9 vs. 78.5).

Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles a los cambios de temperatura, por lo cuál, se ha recomendado almacenar al semen de cerdo diluido en estado líquido a temperaturas de 15 a 18°C (1,2,4,5,8,23).

Por otro lado, durante el procesamiento del semen en el laboratorio para su dilución y almacenamiento ocurren cambios irreversibles en la motilidad progresiva y en la morfología acrosomal (5.7,30).

La motilidad progresiva del semen diluido es el parámetro más utilizado para evaluar una dosis destinada para la IA; además la evaluación de los daños acrosomales brinda información adicional importante de la viabilidad de las dosis (29).

El propósito de éste trabajo fué evaluar los porcentajes de motilidad y daños acrosomales en los espermatozoides de cerdo almacenados en los diluentes BB y BTS a lo largo de una semana.

MATERIAL Y METODOS

a) El trabajo se realizó en el laboratorio de IA del Centro de Investigaciones Delta, localizado en la calle de Villagrán 90, La Piedad, Michoacán.

La ciudad de La Piedad se ubica en la parte noroeste del estado de Michoacán, en el límite con el estado de Jalisco; se sitúa en las coordenadas 20°20'30" latitud norte y 102°01' longitud oeste, a una altitud de 1690 metros sobre el nivel medio del mar. El clima de la zona es semicálido, subhúmedo, con lluvias en verano, la precipitación del área fluctúa entre 720 y 900 mm anuales. La temperatura media anual en esta ciudad alcanza los 20.9°C; el mes más cálido es mayo, con 24.1°C y el mes más frío es enero, con 14°C (20).

b) Animales Experimentales: se utilizaron veintiún sementales de las razas Duroc, Berkshire, Yorkshire, Hampshire y Landrace. Los sementales contaban con edades entre 10 y 14 meses de edad. Los verracos se entrenaron para montar al potro de colección desde los seis o siete meses de edad. Cada verraco tiene su corral individual y reciben dos kilogramos de alimento balanceado al día.

El semen de cada verraco se evalúa de forma rutinaria, llenando un registro que se completa según los resultados obtenidos de cada colección, con lo que se determina su calidad para la elaboración de dosis destinadas para la IA.

Todos los verracos son vacunados y desparasitados de acuerdo al calendario de vacunación del Centro.

c) Procedimiento Experimental: para realizar la colección del semen, se practicó la técnica de la mano enguantada (11,14). Antes de la colección se cuidaba de vaciar la orina residual de los sacos prepuciales de cada verraco ya que es nociva para los espermatozoides (18). El eyaculado se colectó en un frasco térmico de plástico con una bolsa de polietileno en su interior, pasándolo por un embudo con una gasa de algodón que funciona como filtro para eliminar la porción gelatinosa del eyaculado.

Cada día se tomó una muestra de semen recién colectado. Se usaron 18 muestras en total; once de ellas se elaboraron con el eyaculado de un solo semental y las otras siete con la mezcla de eyaculados de varios sementales, según las necesidades del centro. Cada muestra se dividió en dos partes, una se diluyó en BB y la otra en BTS. Las muestras tuvieron una concentración espermática de cinco mil millones diluidos en 100 ml; para lograrlo se realizó una dilución 1:200 con la pipeta de Thoma, siendo una solución de citrato de sodio con formalina el solvente, y el semen, el soluto; una vez hecha la dilución en la pipeta se agitó y se tiraron 3 o 4 gotas, para luego colocar un par de gotas en la cámara del hematocitómetro (cámara cuenta glóbulos) y se procedió al contéo de los espermatozoides para determinar la cantidad de éstos por ml de semen (31). En seguida se describe la

composición de los diluentes.

BB	Cantidad (g)
Dextrosa.....	30
Citrato trisódico.....	16
Bicarbonato de sodio.....	8.5
EDTA.....	2.5
Tris.....	15.3
Cisteína.....	0.4
Agua deionizada.....	cbp 1000 ml

BTS (Beltsville Thawing Solution)	Cant. (g)
Dextrosa.....	37
Citrato trisódico.....	6
Bicarbonato de sodio.....	1.25
EDTA.....	1.25
Cloruro de potasio.....	0.75
Gentamicina.....	0.030
Agua deionizada.....	cbp 1000 ml

Las dosis se mantuvieron a 15°C en una incubadora. De cada una se tomó una alícuota al terminar de hacer la dilución (cero h) y uno, tres, cinco y siete días después (24, 72, 120 y 168 h).

En cada alícuota se evaluó la motilidad. Al efecto se mantenía en baño María a 37°C por cinco minutos, con una pipeta Pasteur se tomaba una muestra del semen diluido y se ponía una gota entre un portaobjetos y un cubreobjetos y éstos sobre una termoplatina a 37°C, luego se observaba en el microscopio de luz la motilidad progresiva de los espermatozoides. Además, se evaluaba el daño acrosomal colocando unas dos o tres gotas del semen diluido en un vial con 1 ml de glutaraldehído al 2.5%, luego se disponía una gota del mismo entre un portaobjetos y un cubreobjetos y se observaba al microscopio de contraste de fases (objetivo PH3)

para registrar la cantidad de acrosomas normales, dañados, perdidos o degenerados en un total de 200 espermatozoides (22,23,29).

d) Análisis Experimental: la motilidad, la proporción de acrosomas normales, dañados, perdidos y degenerados se compararon mediante un análisis de covarianza en bloques, cuyo modelo incluyó el efecto del diluyente (BB o BTS), el efecto lineal, cuadrático y cúbico de la hora considerada como covariable, la diferencia de pendiente lineal y cuadrática entre los diluyentes, el efecto del tipo de semen (con eyaculado simple o múltiple) y el eyaculado como bloque anidado en el tipo de semen. Para las distintas proporciones de acrosomas se utilizó la transformación angular (arco seno \sqrt{p}), para la motilidad no se hizo transformación alguna ya que aunque se expresa en porcentaje, no es precisamente una evaluación porcentual (19).

RESULTADOS

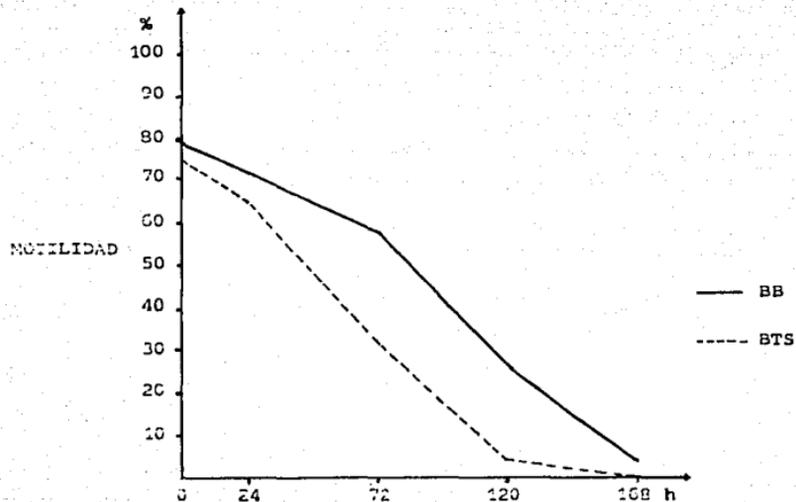
La motilidad varió significativamente con el tiempo (efecto lineal, cuadrático y cúbico; $P < 0.01$), siendo el cambio distinto entre diluentes. La caída en la motilidad fue más temprana ($P < 0.01$) en el semen diluido en BTS que en el conservado en BB (Gráfica 1). La motilidad promedio fue similar en el semen de eyaculados simples y en la mezcla de eyaculados ($P > 0.05$).

La proporción de acrosomas normales fue distinta entre diluentes y tuvo una reducción significativa con el tiempo ($P < 0.01$). La tendencia a lo largo del tiempo fue similar entre diluentes ($P > 0.05$), indicando que la disminución ocurrió en curvas similares pero en todo momento la proporción de acrosomas normales fue mayor en el semen diluido en BB (Gráfica 2).

El porcentaje de acrosomas dañados no mostró efecto significativo de ninguno de los factores analizados ($P > 0.05$), debido a la gran variabilidad que tuvo (coeficiente de variación mayor a 100%). Aún así la tendencia aparente fue hacia un incremento a lo largo del tiempo (Gráfica 3).

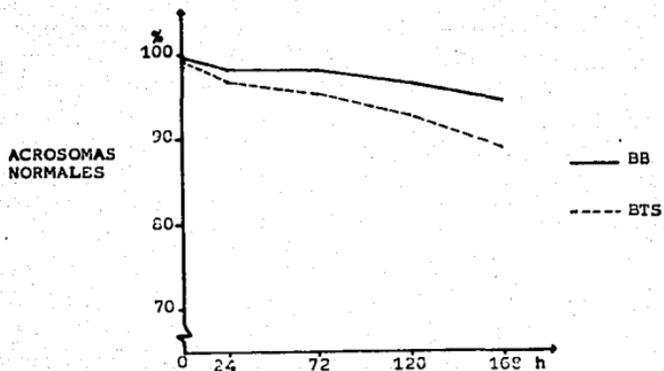
La proporción de acrosomas perdidos fue distinta entre diluentes ($P < 0.05$) y aumentó significativamente con el tiempo ($P < 0.01$). Las curvas de ambos diluentes mostraron tendencias similares ($P > 0.05$), de manera que la curva del diluyente BTS fue más alta y paralela a la de BB (Gráfica 4).

Gráfica 1



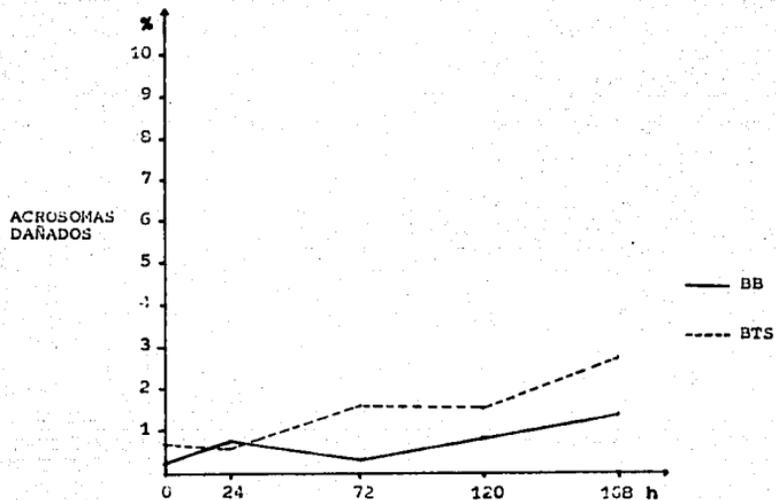
Gráfica 1: Motilidad de semen diluido en BB y BTS a lo largo de siete días.

Gráfica 2



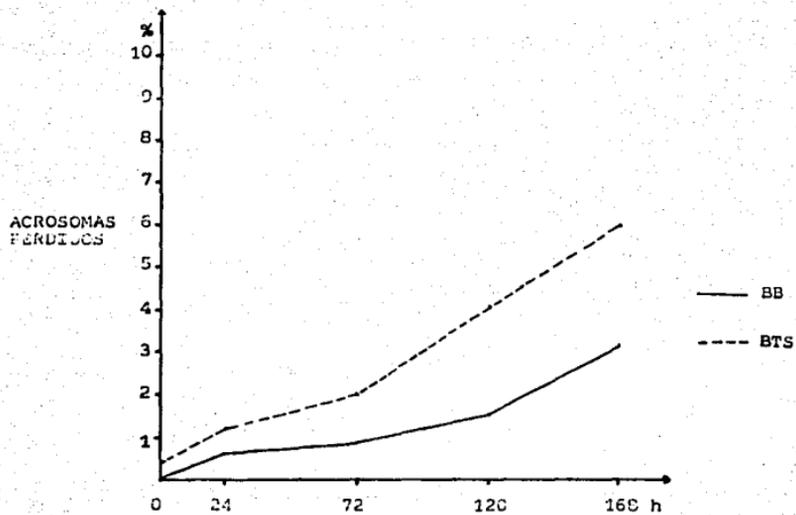
Gráfica 2: Porcentaje de acrosomas normales con los diluyentes BB y BTS a lo largo de siete días.

Gráfica 3



Gráfica 3: Porcentaje de acrosomas dañados con los diluyentes BB y BTS a lo largo de siete días.

Gráfica 4



Gráfica 4: Porcentaje de acrosomas perdidos con los diluyentes BB y BTS a lo largo de siete días.

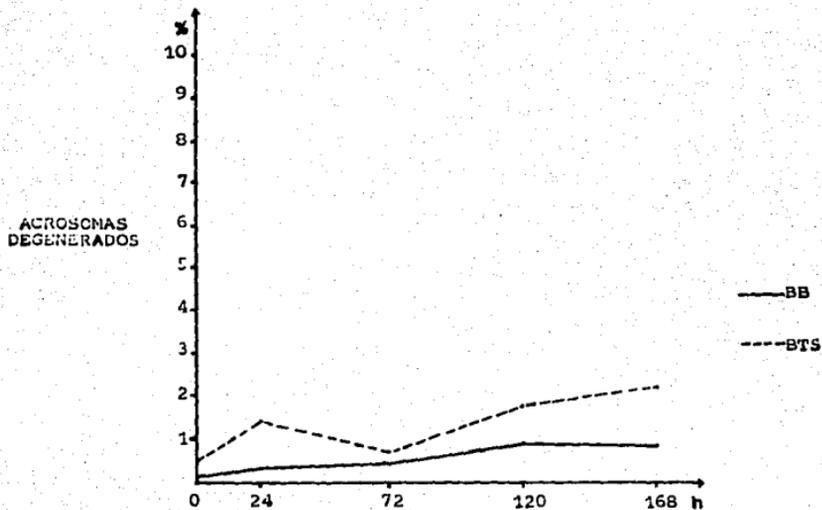
La proporción de acrosomas degenerados aumentó significativamente con el tiempo ($P < 0.05$) pero no fue distinto entre diluentes ni entre tipo de semen ($P > 0.05$) (Gráfica 5).

La variabilidad de los resultados fue menor cuando la muestra era de la mezcla de varios eyaculados que cuando provenía del eyaculado de un solo semental.

La motilidad, la proporción de acrosomas dañados y degenerados fue semejante en las muestras de eyaculados simples y en la mezcla de varios eyaculados ($P > 0.05$). La proporción de acrosomas normales fue mayor en las muestras con mezcla de varios eyaculados que en las muestras de eyaculados simples (96.52 vs 95.69%) ($P < 0.01$).

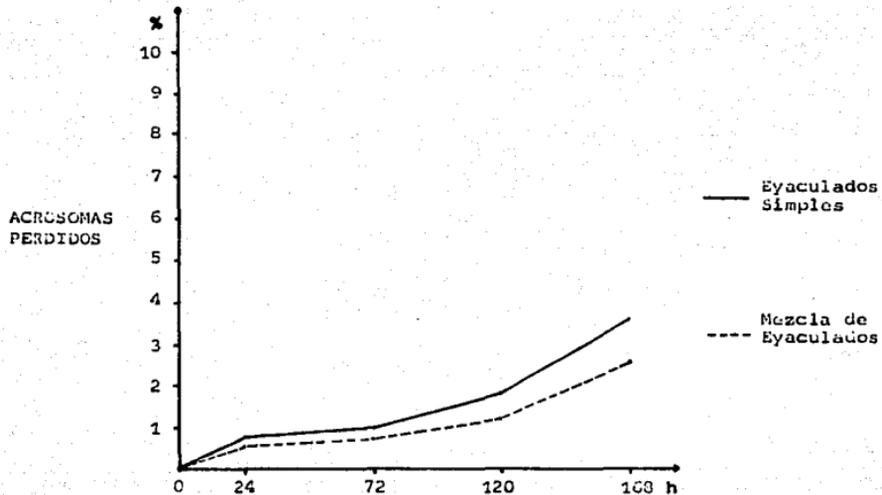
El porcentaje de acrosomas perdidos fue menor en las muestras con mezclas de eyaculados que en las muestras con eyaculados simples ($P < 0.01$) (Gráficas 6 y 7).

Gráfica 5



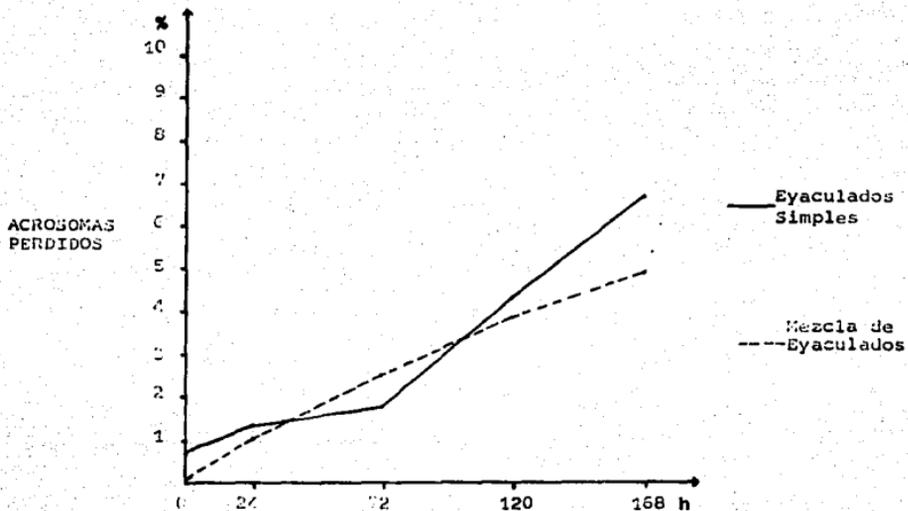
Gráfica 5: Porcentaje de acrosomas degenerados con los diluyentes BB y BTS a lo largo de siete días.

Gráfica 6



Gráfica 6: Porcentaje de acrosomas perdidos en el diluyente BB con eyaculados simples y con mezcla de eyaculados a lo largo de siete días.

Gráfica 7



Gráfica 7: Porcentaje de acrosomas perdidos en el diluyente BTS con eyaculados simples y con mezcla de eyaculados a lo largo de siete días.

DISCUSION

El proceso de dilución, el tipo de eyaculado y el tiempo de almacenaje del semen diluido de cerdo para la IA, afectan significativamente la motilidad progresiva y la cantidad de espermatozoides con acrosomas normales, debido a que estas células sufren cambios irreversibles en su motilidad y morfología acrosomal durante su manejo en el laboratorio. Dichos cambios se incrementan con el tiempo de almacenaje y se deben a la presencia de proteínas básicas del plasma seminal que aumentan la permeabilidad de las células espermáticas permitiendo la salida de proteínas, cationes celulares y enzimas como la transaminasa glutámica oxalacética, hialuronidasa y acrosina, que son necesarias para apoyar el proceso de capacitación espermática, además del acúmulo de productos metabólicos como amoníaco, ácido láctico, ácido pirúvico y ácido carbónico, que también dañan a los espermatozoides (5,12,26,27,30).

Johnson et al. (16) compararon la fecundidad del semen de cerdo diluido en Beltsville Thawing Solution (BTS), Modified Modena (MM) o MR-A almacenados a 18°C y utilizándolo para inseminar al primero, segundo, tercero y cuarto día después de la colección; encontrando resultados similares a trabajos hechos con anterioridad (3,4,5,14,21,25), además señala que las dosis diluidas en BTS utilizadas al cuarto día posterior a su colección, tenían el mismo porcentaje de pariciones que las aplicadas el primer día posterior a la colección, siempre

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

y cuando las del cuarto día contuvieran el doble de concentración espermática, es decir seis mil millones por ml. Los resultados obtenidos en éste trabajo con el diluyente BTS tanto en motilidad como en porcentaje de acrosomas normales están dentro de los rangos obtenidos por otros autores (3,4,5,13,15,23,25,30).

Mientras que los resultados obtenidos en éste trabajo con el diluyente BB se asemejan a los resultados obtenidos por Pursel et al (23), en donde almacenó semen diluido en Illinois Variable Temperature (IVT) saturado con CO₂ a 15°C durante 72 h obteniendo: a las 24 h porcentajes de motilidad y acrosomas normales de 78 y 96 y a las 72 h de 52 y 95 respectivamente. Con BB se obtuvo: a las 24 h porcentajes de motilidad y de acrosomas normales de 72.22 y 98.17 y a las 72 h de 58.06 y 98.2 respectivamente.

La motilidad disminuyó más rápidamente que el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales durante el almacenaje, debido a que la primera es la más afectada por el enfriamiento y a que el espermatozoide de cerdo es muy sensible a ello, además de afectarse también por los metabolitos de su actividad enzimática durante el almacenaje (5,7,28).

Debido a la susceptibilidad del espermatozoide de cerdo para poder mantener su viabilidad a temperaturas ambientales o de refrigeración, se ha recomendado su almacenaje a temperaturas entre 15 y 18°C (1,2,4,5,8,23).

Strzezek et al (26), señaló que el almacenamiento de semen diluido entre 18 y 20°C por 24 a 48 h, resultó en un considerable incremento en la actividad de acrosina, aparato aminotransferasa y consumo de O₂ lo que afectó detrimentalmente a los espermatozoides. Debido a lo señalado por los autores las muestras en éste experimento se almacenaron a 15°C.

La valoración de la calidad del semen resulta esencial para seleccionar las dosis destinadas a la IA. La motilidad es uno de los criterios más utilizados para estimar la calidad de la muestra ya que informa de la viabilidad celular. El porcentaje de acrosomas normales proporciona una información adicional de gran valor sobre la viabilidad de las dosis (29). Las muestras de éste experimento se evaluaron al microscopio de contraste de fases de la misma manera en que Vázquez (29) lo indica en su experimento.

Se concluye que el diluyente BB es mejor opción que el diluyente BTS, ya que las condiciones fisiológicas de los espermatozoides en lo que se refiere a motilidad y morfología se mantienen mejor.

Para una conclusión definitiva ésto deberá ser corroborado con estudios donde se insemine cerdas utilizando semen diluido en BB y ETS a diferentes tiempos de almacenaje, y se comparen las tasa de fertilidad alcanzadas con uno y otro diluente.

LITERATURA CITADA

- 1.- Aalbers, J.G., Johnson, L.A., Willems, C.M.T., Rademaker, J.H.M. and Rexroard, C.E.: Fecundity of boar spermatozoa after storage at 18°C for up to three days. *J. Anim. Sci.* 53 suppl. 1:355 (1981).
- 2.- Aalbers, J.G., Johnson, L.A., Willems, C.M.T., Rademaker, J.H.M. and Rexroard, C.E.: Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III Fecundity of boar spermatozoa in Beltsville Liquid and Kiev extenders for three days at 18°C. *J. Anim. Sci.* 54 1:132-136 (1982).
- 3.- Aalbers, J.G., Rademaker, J.H.M., Grooten, H.J.G., and Johnson, L.A.: Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions. *J. Anim. Sci.* 57 suppl. 1:314-315 (1983).
- 4.- Aalbers, J.G., Johnson, L.A., Rademaker, J.M.H. and Grooten, H.J.G.: Use of boar spermatozoa for AI: fertility and morphology of semen diluted in BTS and use for insemination within 24 h or 25 h after collection. *10th Int. Congr. Anim. Reprod.* AI. Illinois, USA., 1984.
- 5.- Amézaga, C.G.: Evaluación del daño acrosomal en espermatozoides de semen de cerdo almacenados en BTS. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987.
- 6.- Bamba, K. and Stone, M.: Factors affecting the quality of boar semen stored by means of dialysis. *J. Reprod. Fert.* 62 1:193-197 (1981).
- 7.- Bamba, K. and Cram, D.G.: Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J. Reprod. Fert.* 75 1:133-138 (1985).
- 8.- Bamba, K. and Cran, D.G.: Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *J. Reprod. Fert.* 82 (2): 509-518 (1988).
- 9.- Bovard, K.P., Knight, J. and Tambllyn, T.M.: Long term storage of liquid boar spermatozoa: In vitro parameters. *J. Anim. Sci.* 53 1:54 (1981).
- 10.- Bundy, C.E., Viggins, R.N., Christensen, V.W.: Producción Porcina. *C.F.C.S.A. México*, D.F., 1976.
- 11.- Galina, C., Saltiel, A., Valencia, J., Becerril, J., Bustamante, G., Calderon, A., Duchateau, A., Fernández, S., Olguin, A., Páramo, R. y Zarco, L.: Reproducción de Animales Domésticos. *Limusa*. México, D.F., 1986.

- 12.-Hafez, F.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F., 1984.
- 13.-Hancock, J.L.: The morphology of boar sperm. *J. Roy. Micro. Soc.* 76:84 (1957).
- 14.-Hurtgen, J.P., Larsen, R. and Crabo, B.: Factors affecting the semen quality in the boar. *Proc. 9th Congr. Anim. Reprod.* Madrid, Spain (1984).
- 15.-Im, K.S. and Chung, C.Y.: Studies of storage of fresh and frozen boar semen. *Pig News Inf.* 2 1:72 (1981).
- 16.-Johnson, L.A., Aalbers, J.G. and Grooten, H.J.G.: Artificial Insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zucht.* 23 2:49-55 (1988).
- 17.-Lafranchi, V.E.: Observaciones estacionales sobre algunos parámetros reproductivos del ganado porcino en el Valle de México. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.
- 18.-Leman, A.D.: Porcine. In: Current Therapy in Theriogenology. Edited by: Morrow, D.A. W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA., 1980.
- 19.-Méndez, I.: Comentarios sobre el diseño y análisis de experimentos con animales. *Com. Tec. 67 Int. Inv. Mat. Apl. y Sist.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.
- 20.-Michoacán Cuaderno de Información para la Plancación. INEGI. SPP. México, D.F., 1986.
- 21.-Paquignon, S. and Courrot, M.: Advances in boar semen preservation technology in France. *Pig News Inf.* 2 4:397-400 (1981).
- 22.-Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Rampacek, G.B.: Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34 1:278-283 (1972).
- 23.-Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L.: Acrosome morphology of boar spermatozoa during *in vitro* aging. *J. Anim. Sci.* 38 1: 113-116 (1974).
- 24.-Pursel, V.G.: Preservation of boar semen above 15°C: Effects of storage temperature, extender and container. *J. Anim. Sci.* 57 suppl. 1:125-126 (1983).

- 25.-Ramirez, R.R.A.: Evaluación de dos diluyentes para preservar al semen de cerdo en estado líquido. Tesis de licenciatura. *Fac. Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1984.
- 26.-Strzezek, J., Smigrelska, J. and Liminowici, J.: Metabolism of boar semen diluted in different diluents and stored at 18-20°C. *Pig News Inf.* 3 1:116 (1982).
- 27.-Suzuki, H. and Niwa, T.: Variation in intracellular enzymes, specially glutamic oxalacetic transaminase and hyaluronidase during storage of boar spermatozoa. *Pig News Inf.* 5 1:62 (1984).
- 28.-Thacker, G.J., Larsen, R.E., Joo, H.J. and Leman, A.D.: Swine diseases transmissible with AI. *J. Anim. Vet. Med. Assoc.* 185 5:511-516 (1984).
- 29.-Vázquez, I.: Valoración de los acrosomas normales en células espermáticas de verraco. *Zoot.* 29 10:507-512 (1980).
- 30.-Vengust, M., Illera, M.J., Senegacnik, J., Petrac, D. and Bester, M.: Relation between some boar semen characters and adaptability to liquid storage and freezing. *Pig News Inf.* 5 4:489 (1984).
- 31.-Villamil, P.F.: Manejo del verraco para la inseminación artificial: Estudio recapitulativo. Tesis de licenciatura. *Fac. Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987.