

11621  
30



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“Comparación de los cambios en la calidad  
del semen de verraco durante su  
almacenamiento en dos diluyentes diferentes”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

**JUAN CARLOS GONZÁLEZ BASTIDA**

**ASESORES:**

**M.V.Z. ROMAN JAVIER MARTÍNEZ RAMÍREZ  
PHD. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

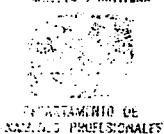
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares-  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Comparación de los cambios en la calidad del semen de verraco durante su almacenamiento en dos diluyentes diferentes".

que presenta el pasante: Juan Carlos González Bustida  
 con número de cuenta: 9256711-1 para obtener el título de :  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Octubre de 1 2003

PRESIDENTE	<u>Dr. Fernando Osaya Gallardo</u>	
VOCAL	<u>M.C. Arturo Trejo González</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Román Javier Martínez Ramírez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. C. Humberto Flores Vázquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.C. Rosalba Soto González</u>	

B

**DEDICATORIAS:**

**A mis padres: Guadalupe y Severo por darme el don de la vida, por su infinito amor y apoyo incondicional y por el ejemplo que me han heredado.**

**A mi esposa Verónica por todo su amor, apoyo y dedicación y por haberme regalado la dicha de ser padre.**

**A mis hijos: Arlette, Karla y Jesús por llenar mi vida de felicidad, los quiero mucho.**

**A mis hermanos: Eligio, Fidel, Delia y Rosa por todo su apoyo brindado.**

**A mis compañeros de la Generación 92-96 de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial a mis amigos: Sergio, Ricardo, Alfredo, Alejandra, Jorge, Manuel y Vicky.**

**Al MVZ. Román Martínez por su dedicación y paciencia, pero sobre todo por su amistad.**

**Al Dr. José Alfredo Medrano por su gran colaboración en la elaboración de este trabajo.**



**AGRADECIMIENTOS:**

**A mis padres por haberme dado una formación profesional, gracias a ustedes he terminado esta carrera y siempre se los estaré agradeciendo.**

**A mi esposa y hermanos por todo el apoyo que siempre me han brindado.**

**A mis compañeros de Escuela con los que he compartido momentos y siempre me brindaron su amistad.**

**A mis compañeros y amigos de la Sedagro Zumpango por su apoyo moral para terminar el trabajo de tesis.**

**A mis profesores gracias por las enseñanzas dentro y fuera de las aulas.**

**A mis asesores gracias por brindarme su tiempo y conocimientos para la realización de ésta tesis**

**A Dios gracias por haberme permitido cumplir una meta más en la vida.**

D

## INDICE

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	2
3.- Objetivo.....	14
4.- Material y Métodos.....	15
5.- Resultados.....	22
6.- Discusión.....	24
7.- Conclusiones.....	28
8.- Bibliografía.....	29
9.- Anexos.....	31

U

## 1.- RESUMEN

En México la producción de carne de cerdo es una fuente importante de empleo y alimento. Uno de los factores de productividad es la eficiencia reproductiva, por lo tanto la inseminación artificial es una herramienta importante para obtenerla.

El semen de verraco fresco debe utilizarse 2 a 3 horas después de ser obtenido, de ahí la importancia de utilizar un medio (diluyente) en el cual el semen pueda ser preservado por varios días para poder ser usado en otro momento y/o lugar.

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar cual de dos diluyentes evaluados: Modena o MR-A es más eficiente para preservar la motilidad general, viabilidad y morfología normal del semen de verraco durante 80 horas de almacenaje.

Se utilizaron 30 eyaculados de verracos clínicamente sanos, obtenidos mediante la técnica de la mano enguantada (Sorensen 1982). Se realizó una evaluación microscópica (motilidad general, viabilidad y morfología normal). Cada eyaculado se dividió en dos partes iguales; centrifugándose a 2500 r.p.m. durante 3 minutos para separar los espermatozoides de los fluidos seminales. Una porción fue diluida en el diluyente Modena a una concentración de  $50 \times 10^6$  por ml y la otra porción fue diluida en MR-A a la misma concentración. Todos estos procedimientos se realizaron a 37°C.

Las diluciones fueron transportadas al laboratorio, permitiendo que la temperatura fuera descendiendo paulatinamente hasta 15°C, temperatura a la que permanecieron durante la toma de muestras. En el laboratorio se tomaron 11 muestras por dilución cada 8 horas, a las cuales se les evaluó: motilidad general, viabilidad y morfología normal.

En lo que respecta a viabilidad y morfología normal no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diluyentes.

La motilidad general para el diluyente Modena a la hora cero fue de 68.3% y a la hora 80 (final del muestreo) de 56.1%. Para el diluyente MR-A a la hora cero fue de 45.8% y para la hora 80 de 9.6%. En esta variable de respuesta existió una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0005$ ).

El diluyente Modena preserva mejor que MR-A la motilidad general de los espermatozoides durante el tiempo de almacenaje.

## **2.- INTRODUCCION**

### **Reseña histórica de la inseminación artificial (I. A.) en general**

En un libro árabe publicado en el siglo XIV se habla de que un árabe recogió semen mediante un trozo de algodón de la vagina de una yegua recién servida y luego insertando este algodón en la vagina de su propia yegua logró que se produjera la concepción. Lewenhoek y Hamm observaron espermatozoides en 1677, según Dobell (Martín Rillo, 1982).

La primera investigación científica sobre I. A. en animales se realizó en perros en 1780 el científico italiano Spallanzani. En el siglo XVIII Malpighi logró la fecundación de huevos de seda. A principios de siglo pasado, Amantea construye el primer modelo de vagina artificial en borregos, que posteriormente fue mejorada por otros investigadores (Duran del Campo, 1980).

A comienzos de siglo pasado los investigadores comenzaron a percibir el posible valor de la I. A. En 1907, Ivanov informó de resultados exitosos en una serie de I. A. en yeguas, vacas y ovejas, como un medio para el amplio mejoramiento genético de los animales domésticos. Como resultado se estableció un laboratorio en Rusia antes de 1914. Durante 1930, investigadores soviéticos probaron el valor de varios lípidos, incluyendo yema de huevo y leche, para proteger a los espermatozoides del shock frío. A mediados del siglo pasado se elaboró el diluyente general de aceptación, yema de huevo citrato. El uso de diluentes apropiados permitió la refrigeración de semen a 2-5°C y su conservación por cortos periodos de tiempo (Maxwell, 1984).

A la mitad de siglo pasado, se realizó el más significativo descubrimiento sobre la congelación de semen, las propiedades crioprotectoras del glicerol. Así se hizo



posible congelar semen a  $-79^{\circ}\text{C}$  prolongando indefinidamente la vida de los espermatozoides (Duran del Campo 1980).

#### **Reseña histórica de la I. A. en cerdos.**

La I. A. en porcinos ha progresado muy rápidamente en los últimos años con el desarrollo de procedimientos que la hicieron práctica para su uso en campo. En países tales como Rusia, Japón, Noruega, Holanda, Francia, Alemania y Dinamarca (Martín Rillo, 1982).

Las tasas de concepción que antes eran bajas, están ahora a un nivel mundial más alto. Este progreso se logró mediante una mejor dilución del semen y aplicando técnicas perfeccionadas de almacenaje, pero lo más importante es el mejoramiento de los procedimientos de manejo y de detección de estro.

La I. A. porcina se inició científicamente en la Ex Unión Soviética en el año de 1932, donde Milanov realizó la primera inseminación exitosa en el ganado porcino. El desarrollo a gran escala de esta técnica en la especie porcina tuvo lugar a partir de la década de los años cincuenta, tanto en la URSS como en los países de Europa del Este (Martín Rillo 1982).

En el año de 1951 se inauguró en Loudeac Francia, el primer centro de I. A. porcina. No obstante, el impulso más importante de esta técnica en Europa, América del Norte y Japón la proporciona la "Reunión Internacional de París", sobre la reproducción e I. A. porcina en el año de 1959 donde se expusieron la mayoría de los trabajos de investigación de la I. A. porcina realizados hasta ese entonces. La I. A. es una herramienta importante para obtener nuevas líneas genéticas superiores y alcanzar una alta eficiencia reproductiva. Esta técnica se

basa en el depósito de semen de un macho en el aparato reproductor de una hembra para facilitar la fecundación por procedimientos mecánicos (Martín Rillo, 1982; Sorensen, 1991).

La técnica de I. A. es un elemento básico que influye de manera importante en la tasa de fertilidad, esta técnica debe ser realizada por personal capacitado que siga una metodología con precisión y destreza, evitando utilizar personal que realice actividades con poca higiene y dedicación. Se debe estimular a la cerda mediante la presencia del verraco maduro y de buena libido, este estímulo incluye el contacto visual, olfativo y auditivo lográndose de esta manera un mayor estímulo (Sorensen,1991).

#### **Ventajas de la I. A. porcina.**

##### ***Genéticas:***

- 1- Utilización racional de los mejores reproductores. Con la I.A. un verraco de elite puede cubrir un número mucho mayor de cerdas que en monta natural.
- 2- Disminuye de la variabilidad genética. Las posibilidades de elección son menores y puede restringirse el número de verracos disponibles en la explotación.
- 3- Posibilidad de utilizar verracos evaluados.
- 4- Utilizar en forma más racional las estaciones de pruebas de progenie.
- 5- Mantener realmente las líneas puras cuando el aumento de la consanguinidad dificulta la reproducción.

### **Sanitarias:**

- 1- Posibilita el aislamiento sanitario de la explotación al reducirse o incluso eliminarse la entrada de verracos ajenos a ella.
- 2- Evita la difusión de enfermedades por medio del verraco.
- 3- Permite el control mas profundo de las cerdas en el momento de la cubrición.

### **Productivas:**

- 1- Disminuye el número de verracos en la explotación o se eliminan éstos.
- 2- Se eliminan traslados de animales que llevan consigo perdida de tiempo y estrés para el animal.
- 3- No hay problema con la falta de libido o con el limitado potencial sexual de algunos verracos.
- 4- Permite cruzar animales de distinto peso que en monta natural no se podría.
- 5- Se evita la sobreutilización de verracos.
- 6- El momento de la cubrición puede ser el más adecuado para la cerda sin que esté limitado por factores del verraco.
- 7- De cara al matadero se consigue una mayor homogeneidad en los lotes.

### **Económicas**

- 1- Disminución del riesgo en el aspecto sanitario.
- 2- Ahorro de espacio, alimentación, mano de obra al disminuir el numero de verracos.
- 3- Mejor utilización de la mano de obra al ~~facilitarse~~ facilitarse el manejo.

- 4- Mejorar rendimientos de producción al utilizar verracos de mayor valor genético (Lievano, 1989).

**Desventajas:**

- 1- De la dilución de un eyaculado no se puede obtener un gran número de dosis (de un toro se obtiene 10 veces mas en número de dosis)
- 2- El tiempo de conservación del esperma es reducido.
- 3- Se reduce la variabilidad genética.
- 4- El poder fecundante del esperma esta enormemente influido por las condiciones del medio y es muy variable.
- 5- El potencial de transmisión de características indeseables no evaluadas es mucho mayor que con monta natural.

**Obtención y recolección del semen**

La obtención del semen es la primera operación sistemática y rutinaria en la práctica de la inseminación artificial y tiene características particulares en el verraco.

La recolección debe hacerse en un lugar hecho especialmente para ello, tranquilo y que facilite el entrenamiento del verraco. El operador debe estar perfectamente adiestrado para realizar las tareas adecuadamente. Todo el equipo debe estar preparado óptimamente para las operaciones subsiguientes. El método de recogida de semen es el de mano enguatada y en un potro fijo. El material utilizado en este método esta constituido por: un guante estéril muy fino que no disminuya demasiado la sensibilidad de la mano, un termo con capacidad de 400

a 500 cc, esterilizado y a la temperatura del semen para evitar el choque térmico ( Flores 1989, Hafez, 1991).

El esperma del verraco se divide en tres fracciones, separadas normalmente con bastante nitidez (Gordon, 1999):

La primera fracción es denominada preespermática: Constituida por las secreciones de la próstata, vesículas seminales y algunos grumos procedentes de las glándulas bulbo uretrales. Estos grumos de consistencia gelatinosa, reciben comúnmente el nombre de tapioca. Esta fracción es muy transparente, carece de espermatozoides y tiene un volumen aproximado de unos 10 cc.

La segunda fracción espermática también denominada rica en espermatozoides esta constituida por espermatozoides y secreciones de las vesículas seminales y próstata. Tiene un color blanquecino lechoso, una gran concentración de espermatozoides que varía de 500 000 a 1 000 000/mm<sup>3</sup>, procedentes de las contracciones que se producen en la cola del epidídimo. El volumen oscila de 30-40 a 90-100 cc., dependiendo de los factores que influyan en la producción espermática.

La tercera fracción o posespermática o pobre en espermatozoides, esta constituida por espermatozoides en muy pequeña cantidad y principalmente, por la secreción de la glándula prostática y por las glándulas bulbo uretrales, sobre todo al final de la fracción.

Entre las especies domésticas el cerdo es el mayor productor de espermatozoides eyaculados diariamente. La cantidad de espermatozoides eyaculados oscila entre 10 a 20 x10<sup>9</sup>, siendo proporcional al peso de los testículos y reservas espermáticas; la diferencia del desarrollo testicular observado entre los verracos

debe estar bajo control genético, y en el momento de elegir reproductores jóvenes debe tenerse en cuenta el desarrollo de su aparato genital. La producción de espermatozoides comienza a los 3 o 4 meses, alcanza niveles normales a los 7 u 8 meses, aumentando hasta la edad de aproximadamente 4 años (Hafez, 1991). en la práctica, la capacidad fecundante de un reproductor se mide por el porcentaje de gestaciones respecto al número de inseminaciones o cubriciones realizadas. Si en la monta natural la calidad de semen es importante, en la inseminación artificial es mucho mayor. Esto es evidente puesto que un eyaculado en mal estado por monta natural solo afectaría a una hembra, mientras que por inseminación artificial pueden afectar hasta 20 hembras. De ahí la importancia que tiene el realizar pruebas para valorar la calidad del semen (Gordon, 1999).

### **Evaluación de semen**

La evaluación seminal es una herramienta básica para poder ofrecer semen de alta calidad e higiene. La evaluación seminal se divide en: evaluación macroscópica y evaluación microscópica. En la evaluación macroscópica se evalúa el color, olor, volumen, pH, siendo esta evaluación de poco valor productivo para la fertilidad. En la evaluación microscópica se evalúan: motilidad, concentración, morfología e integridad acrosomal, este tipo de evaluación es mas completa y nos indica con mayor precisión la calidad del mismo (Hafez, 1991).

### **Evaluación macroscópica**

En un examen macroscópico se debe evaluar el volumen, el color y el olor.

El volumen medio del eyaculado completo de un verraco joven de 9 meses es de 200 cc, el de adulto de 14 a 15 meses es de 300 cc, con variaciones de 100 a 500 cc, dependiendo de las condiciones ambientales e individuales, habiéndose obtenido en ocasiones eyaculados de 700 y 800 cc. En general, estos eyaculados no suelen ser de mejor calidad desde el punto de vista de la morfología celular (Martín Rillo, 1982).

El color del eyaculado depende de la fracción de que se trate, en ocasiones se producen contaminaciones del semen con sangre, orina, suciedad, secreciones prepuciales, supuraciones de origen patológico, como pus y en algunos casos piedras y arenillas normalmente negras o marrones procedentes de las glándulas genitales. Estos elementos extraños producen coloraciones anormales en el semen dando tonalidades rosáceas, amarillentas o pardas (Martín Rillo, 1982).

El olor del semen del verraco es *sui generis* y se caracteriza por estar afectado ligeramente por las feromonas del aparato genital. En el caso de estar contaminado el semen por orina y secreciones prepuciales, el semen adquiere un olor muy fuerte y característico (Martín Rillo, 1982).

### **Evaluación microscópica**

En un examen microscópico la motilidad es la valoración cuantitativa y cualitativa del movimiento de los espermatozoides. La observación de la motilidad se debe realizarse inmediatamente después de la recogida ya que los espermatozoides del verraco pierden rápidamente el movimiento al disminuir la temperatura, aunque solo de forma transitoria, presentando acinesis. Dentro de la motilidad se valoran dos características: en primer lugar, el porcentaje de espermatozoides con

movimiento progresivo, de 0 a 100. Un eyaculado de buena calidad debe tener como mínimo un 80% de espermatozoides con movimiento progresivo (Martín 1982). Cuando se trate de semen conservado, para observar la motilidad es necesario aumentar la temperatura de conservación desde la temperatura de almacenamiento (5 a 15°C) hasta 37°C (Lievano 1989, Kato, 1981).

La concentración consiste en la determinación de espermatozoides por unidad de volumen teniendo en cuenta que la cifra media de concentración del espermatozoides completo del verraco es de 300 000 espermatozoides por mm<sup>3</sup>, el número total de espermatozoides emitidos en cada eyaculado oscila de unos 40x10<sup>9</sup> en verracos jóvenes a 120 a 130 x10<sup>9</sup> en verracos adultos en plena producción (Martín Rillo, 1982).

La problemática que plantea la conservación del semen de verraco es quizá la causa que más ha impedido el desarrollo y la aplicación práctica de la inseminación artificial en el cerdo (Johnson et al; 2000).

La conservación puede realizarse en diferentes formas: fresco, refrigerado, congelado y liofilizado.

El semen fresco es el que se usa a nivel de explotación y, que después de su obtención, puede conservarse a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas para utilizarlo en 4 a 5 hembras. Si queremos conservar el semen más de 3 horas hay que tomar en cuenta que la composición del plasma que se ha unido a los espermatozoides durante la eyaculación tiene la finalidad de estimular el metabolismo celular para conseguir el máximo de actividad durante el transporte espermático (Johnson et al; 2000).



La primera medida que se debe adoptar es añadir al esperma un medio (Diluyente) que equilibre la acción de las sustancias del plasma seminal, manteniendo las células en un estado de inactividad metabólica tal, que asemeje a la que tienen en el epidídimo, para poder recuperar posteriormente esta actividad en el momento de la inseminación (Johnson et al; 2000).

Una vez que el semen es evaluado, tiene que ser conservado en un diluyente que le permitirá mantener condiciones de viabilidad óptimas. Existen dos tipos de diluyente:

- a) corta duración (por ejemplo, Merk y BTS)
- b) larga duración (por ejemplo, MR-A y Modena)

Los diluyentes de corta duración tienen un periodo de conservación aproximado de 3 días y los de larga duración de 5 días, aunque el tamaño de la camada y la fertilidad disminuyen conforme avanza el periodo de almacenamiento (Weitze, 1991).

Para conservar las dosis, se deben mantener a una temperatura de 17°C. Para esto, se debe contar con un conservador especial, éste puede ser una hielera con refrigerantes (monitoreo continuo de temperatura), un refrigerador con un termostato adaptado o un termo conservador especialmente diseñado para este fin. Debe evitarse las fluctuaciones de temperatura, colocando las dosis en posición horizontal para que tengan una mayor superficie de contacto con el medio y sean homogeneizadas por lo menos cada 12 horas para mantener una mayor viabilidad. Las dosis deben ser utilizadas en un periodo de 72 horas independientemente del diluyente utilizado.

Se recomienda utilizar dosis que han sido evaluadas previamente a su utilización, esta evaluación normalmente consta de una evaluación de la motilidad aunque este tipo de evaluación no nos determinará la fertilidad, es importante realizarla porque nos dará un indicativo parcial de la calidad el mismo antes de aplicarla.

Los diluyentes empleados para el semen deben reunir varias características (Reed, 1991):

- ◆ Proporcionar nutrientes para mantener el metabolismo de los espermatozoides.
- ◆ Sustancias amortiguadoras para evitar cambios bruscos de pH.
- ◆ Sustancias crioprotectoras para evitar daños al espermatozoide cuando exista enfriamiento rápido.
- ◆ Adecuada presión osmótica.
- ◆ Electrolitos adecuados y balanceados.
- ◆ Antibióticos para evitar crecimientos bacterianos.
- ◆ Proporcionar suficiente volumen para realizar inseminaciones múltiples.

El criterio para evaluar la capacidad de conservación de un diluyente se realiza con base en el porcentaje de motilidad, viabilidad y morfología normal. Estas características se ven afectadas regularmente durante el procesamiento del semen y también durante el almacenaje (Johnson *et al.*, 2000).

En varios trabajos se han comparado diferentes tipos de diluyentes midiendo el porcentaje de motilidad, viabilidad y morfología, encontrándose que la preservación de estas características depende del tipo de diluyente, del tiempo de conservación y de la temperatura de almacenaje (Pursel 1988; Buyan *et al.*, 1989; Sone *et al.*, 1992).

Además de la evaluación rutinaria existen otras formas de evaluación especiales como el Test de Resistencia osmótica (O.R.T), exámenes bioquímicos, biológicos y microbiológicos, que combinados entre sí nos dan una predicción mayor en la fertilidad del eyaculado (Jonson et al; 2000).

### **3.- OBJETIVO**

**El objetivo del presente trabajo fue determinar cual de los dos diluyentes (Modena o MR-A) es más eficiente para preservar la calidad de los espermatozoides durante 80 horas de almacenamiento con respecto a: motilidad general, viabilidad y morfología normal.**

#### **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **Lugar de la investigación**

La investigación se realizó en el Centro de Investigación y Extensionismo en Producción Porcina (CEIEPP), en el Departamento de Morfología (DM) y en el Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.

Geográficamente el Centro de Inseminación Artificial del CEIEPP, FMVZ UNAM se encuentra en el Municipio de Jilotepec, Estado de México en las siguientes coordenadas: 19° 15" de la latitud norte, entre los meridianos 99° 20' de longitud oeste del meridiano de Greenwich. (S.A.RH.1980).

##### **Diseño experimental**

Se estructuró un experimento factorial 2 x 11, los factores y los niveles fueron:

1. El diluyente:

1. 1. MRA.

1. 2. Modena.

2. El tiempo de almacenamiento postdilución en horas:

2. 1. 00 hrs.

2. 2. 08 hrs.

2. 3. 16 hrs.

2. 4. 24 hrs.

2. 5. 32 hrs.

2. 6. 40 hrs.

2. 7. 48 hrs.

2. 8. 56 hrs.

2. 9. 64 hrs.

2.10. 72 hrs.

2.11. 80 hrs.

Como grupo control fueron tomadas las determinaciones realizadas a las características funcionales y morfológicas de los espermatozoides recién eyaculados y como tratamientos las realizadas a los espermatozoides recién incubados.

#### **Variables de respuesta evaluadas**

I. Motilidad espermática general en porcentaje.

II. Viabilidad

- Espermatozoides vivos (porcentaje).
- Espermatozoides muertos (porcentaje).

III. Morfología

- Espermatozoides normales (porcentaje).
- Espermatozoides anormales (porcentaje).

#### **Obtención de los espermatozoides**

Las muestras espermáticas fueron obtenidas de 30 eyaculados, de 8 verracos clínicamente sanos y sexualmente maduros de las razas Landrace, Duroc, Spot y Hampshire. Los verracos se encontraban alojados en locales con ambiente controlado (20°C) y bajo alimentación especial. Fueron obtenidos 5 eyaculados de diferentes verracos una vez a la semana, durante 6 semanas.

Se tomaron las precauciones necesarias durante y después de la colección espermática para evitar daños por cambios de temperatura.

Se utilizo la técnica de la mano enguantada modificada basada en la descripción que hace Sorensen (1982). Se usa un doble guante de plástico y un termo colector de boca ancha dentro del cual se encuentra un vaso de precipitados con un embudo de plástico cubierto por un filtro de gasa fijado con una liga previamente atemperados a 38° C.

Se permite el acceso del verraco al potro de monta y se espera a que se excite y monte. Entonces con la mano enguantada se masajea el prepucio para que expulse el liquido prepucial. Una vez que se expele todo el contenido, se retira el primer guante, en este momento el verraco ya ha exteriorizado el pene.

Se toma el termo colector armado de su caja de incubación, buscando el momento adecuado para iniciar la colección.

El glande erecto y extendido se toma con la mano, manteniéndolo firmemente al costado del verraco. Es necesario mantener presión moderada sobre el glande para que inicie la eyaculación.

Se desecha la primera fracción de liquido transparente, para recolectar la segunda fracción rica en espermatozoides en el termo. El filtro de gasa detiene las porciones gelatinosas del eyaculado. Cuando la tercera fracción, francamente gelatinosa comienza a salir, se suspende la colección pero se mantiene la presión para permitir que termine completamente el proceso de eyaculación. Finalmente la erección va desapareciendo, el pene se retrae a la bolsa prepucial y es el momento de soltarlo, entonces el verraco desmonta.

El eyaculado obtenido se pone a baño María a 37° C en tanto se hacen las determinaciones necesarias.

### **Procedimiento**

Inmediatamente después de ser obtenidas, muestras alícuotas, de cada eyaculado, fueron tomadas para hacer las determinaciones de: la concentración espermática, el porcentaje de motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Conociendo la concentración espermática, se determinó la tasa de dilución de cada eyaculado, para obtener 2 diluciones de 15 ml cada una, a una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides móviles por ml, con un alto porcentaje de integridad de membrana y morfológicamente normales, en los medios MR-A y Modena. Durante todo el experimento, las diluciones se realizaron y almacenaron en tubos Falcon de 15 ml con tapa de rosca hermética.

Las muestras se transportaron a la FMVZ, en un tiempo promedio de 4 horas desde su obtención. El semen diluido se transportó en un termo a 37°C, la temperatura descendió gradualmente durante el transporte.

Al llegar a la FMVZ, se tomaron muestras alícuotas de los espermatozoides diluidos. Se determinó el porcentaje de motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos, y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

Una vez tomadas las alícuotas, se permitió que la temperatura de los medios fuera descendiendo paulatinamente hasta 15°C en un refrigerador, y se almacenaron en la oscuridad a la misma temperatura, manteniendo los tubos en una posición



totalmente horizontal durante todo el resto del experimento para permitir la mayor superficie de contacto entre el diluyente y los espermatozoides.

Al terminar de tomar las muestras alicuotas para determinar el porcentaje de motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos, y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, se tomaron muestras alicuotas cada 8 horas (11 muestras en total), empezando en la hora 00 y terminando en la hora 80 postransporte en los medios de dilución.

Un resumen esquematizado del protocolo experimental puede verse en el esquema 1.

La composición y preparación de los reactivos utilizados, puede verse en el anexo 1.

La descripción detallada de los métodos de laboratorio utilizados para cada manejo, tratamiento y determinación puede verse en el anexo 2.

#### **Determinación del porcentaje de motilidad espermática**

Muestras de 50  $\mu$ l fueron tomadas y colocadas en el centro de un portaobjetos, previamente atemperado a 37 °C, la gota formada, se cubrió con un cubreobjetos, también previamente atemperado y se hizo la observación al microscopio de luz con el objetivo 10x.

Se determino entonces el porcentaje de espermatozoides que no mostraban ningún tipo de movimiento, y en contraparte el porcentaje de motilidad general. Se observó un campo al centro del portaobjetos por tratamiento.

### **Determinación del porcentaje de espermatozoides vivos**

El porcentaje de espermatozoides vivos (por integridad de membranas), fue determinado tomando muestras de 50  $\mu\text{l}$  y colocadas en un extremo del portaobjetos, adicionándoles 50  $\mu\text{l}$  de colorante Eosina Nigrosina isotérmico a la suspensión de espermatozoides. Con movimientos ondulatorios se homogeneizó la mezcla y con otro portaobjetos se realizó un frotis, el cual se permitió secar al aire.

La proporción de espermatozoides vivos se determinó en un microscopio óptico contabilizando como muertos (membrana no intacta) a los espermatozoides que se tiñeron de color rosa, y como vivos (membrana intacta) los espermatozoides que no se tiñeron. Se contaron 100 células por muestra.

### **Determinación del porcentaje de espermatozoides con morfología normal**

Los frotis preparados para determinar el porcentaje de viabilidad, fueron utilizados para evaluar los espermatozoides que tenían morfología normal y los que tenían anomalías. Se contaron 100 células por tratamiento.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante un Análisis de Varianza de Medidas Repetidas para comparar las diferencias funcionales y morfológicas de los espermatozoides a lo largo del periodo de almacenamiento y para analizar posibles diferencias entre diluyentes. Las tres variables de respuesta se transformaron al arcoseno para normalizarlas. Para realizar el análisis de varianza se empleó el paquete estadístico Stats Versión 5 (Stats Soft, Reino Unido).

Las variables inherentes al verraco, como son raza y edad se manejaron de manera independiente no se tuvo control sobre ellas y se diseño el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + DT_{ij} + E_{ijk}$$

Donde  $Y_{ijk}$  es la variable de respuesta,  $\mu$  es la media poblacional,  $D_i$  es el efecto del diluyente,  $T_j$  es el efecto del tiempo de almacenamiento,  $DT_{ij}$  es el efecto de la interacción del diluyente en el tiempo de almacenamiento y  $E_{ijk}$  es el error aleatorio asociado a cada observación.

## **5.- RESULTADOS**

### **Motilidad**

El porcentaje de motilidad general para el diluyente **Modena** fue **significativamente** mayor ( $P < 0.0005$ ) que el de **MR-A**. El valor a las cero horas fue de 68.3% disminuyendo paulatinamente y al final del muestreo (80 horas) de 56.1%. **Mientras que para el diluyente MR-A. La motilidad general inicial (cero horas) fue de 47.0% y la final a las 80 horas fue de 9.5%. Esto se puede observar en el cuadro 1.**

En la **gráfica 1.** se puede observar que a las 40 horas y a las 80 horas es donde se observa la mayor diferencia a favor del diluyente **Modena** contra **MR-A** en cuanto a porcentaje de motilidad general.

### **Viabilidad**

En el cuadro 2. se puede observar que el porcentaje de viabilidad para el diluyente **Modena** comenzó a las cero horas con un 90.3% y terminó a las 80 horas con un 78.2%. Para el diluyente **MR-A** la viabilidad de los espermatozoides comenzó a las cero horas con un 90.0% y terminó a las 80 horas con un 81.4%; estos valores no fueron diferentes estadísticamente ( $P > 0.05$ ).

En la **gráfica 2.** se puede observar que los dos diluyentes comienzan con un porcentaje similar, pero en cuanto a tiempo de almacenaje de los espermatozoides (80 horas) existe una pequeña diferencia a favor del diluyente **MR-A**.

### **Morfología normal**

En el cuadro 3. se puede observar que el porcentaje de morfología normal para el diluyente Modela comenzó a las cero horas con un 93.4% y terminó a las 80 horas con un 90.1%. Para el diluyente MR-A la morfología normal de los espermatozoides comenzó a las cero horas con un 94.4% y terminó a las 80 horas con un 91.5%, no existieron diferencias significativas entre los diluyentes ( $P>0.05$ ).

En la gráfica 3. se observa que ambos diluyentes mantienen similares porcentajes de morfología normal durante el transcurso del tiempo de almacenaje, ambos diluyentes comienzan con un 95% de espermatozoides con morfología normal y terminan con un 90%.

Cuadro 1. El siguiente cuadro muestra las medias de cada una de las lecturas a los 11 diferentes tiempos de almacenaje en lo que se refiere a la variable de motilidad general.

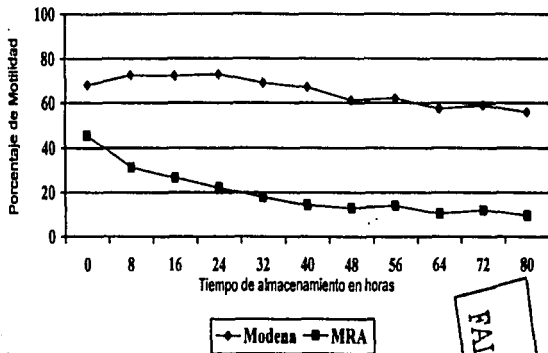
Tiempo de almacenamiento											
Diluyente	00	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80
Modena	68.3±24	72.5±10	72.2±8.6	73.0±12	69.1±12	67.2±14	61.3±20	62.2±16	57.5±22	59.1±16	56.1±17
MR-A	45.7±27	31.3±22	26.7±19	22.1±21	18.0±22	14.3±19	13.1±21	14.2±20	10.4±15	12.1±17	9.5±13.7

Los valores son medias ± desviación estándar

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

23-A

Grafica 1. Presenta como se comportan los resultados de Motilidad general en cada Diluyente



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23-B

Cuadro 2. El siguiente cuadro muestra las medias de cada una de las lecturas a los 11 diferentes tiempos de almacenaje en lo que se refiere a la variable de viabilidad espermática.

Tiempo de almacenamiento											
Diluyente	00	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80
Modena	90.3±3.9	89.6±4.8	87.5±7.0	87.2±5.1	85.3±9.5	85.4±6.7	85.3±8.1	86.2±5.8	84.0±6.6	81.3±8.8	78.1±8.1
MR-A	90.0±3.2	88.1±4.2	89.7±5.2	86.7±6.1	88.1±4.7	87.1±4.3	85.1±6.0	86.7±4.6	84.0±7.4	83.1±7.1	81.4±5.8

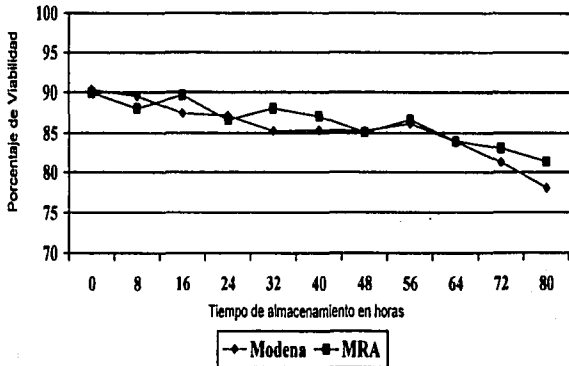
Los valores son medias ± desviación estándar

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23-C



Gráfica 2. Presenta como se comportan los resultados de Viabilidad en cada diluyente.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23-D

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

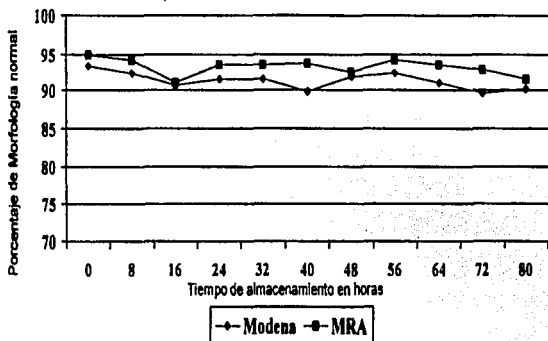
E-32

Cuadro 2. El siguiente cuadro muestra las medias de cada una de las lecturas a los 11 diferentes tiempos de almacenaje en lo que se refiere a la variable de Morfología normal.

Tiempo de almacenamiento											
Dituyente	00	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80
Modena	93.4±4.5	92.4±6.0	90.7±9.7	91.5±4.6	91.6±5.1	89.9±7.3	91.9±6.6	92.3±4.7	91.0±5.9	89.6±7.1	90.1±7.3
MR-A	94.9±3.0	94.3±5.8	91.0±9.1	93.6±4.5	93.6±4.4	93.8±2.9	92.5±5.5	94.3±4.3	93.5±4.3	92.8±4.0	91.5±6.0

Los valores son medias ± desviación estándar

Grafica 3. Presentan como se comportan los resultados de Morfología normal en cada Diluyente



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23-F

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

## **7.- DISCUSIÓN**

Los diluyentes que han resultado ser más satisfactorios durante un periodo de almacenamiento en la preservación de la motilidad son aquellos que contienen: glucosa, yema de huevo o leche, como la fuente principal de nutrientes (Lievano, 1989; Hafez, 1991).

En este trabajo al hacer cada lectura (cada 8 horas) se homogenizaba a los espermatozoides en el tubo donde estaban depositados en sus diluyentes; porque se ha demostrado que el homogeneizar con frecuencia a los espermatozoides en su diluyente marca diferencias altamente significativas contra semen que no es agitado durante su almacenamiento con relación a su motilidad y viabilidad, al igual que el porcentaje de acrosomas normales (Rodríguez et al, 1993).

En el presente trabajo encontramos que el semen diluido en el medio Modena presentó mejor motilidad durante el periodo de almacenamiento que el semen diluido en el medio MR-A. Esto es diferente a lo mencionado por Johnson et al. (1988) quienes compararon los diluyentes BTS, Modena y MR-A, empleando semen de 1, 3 y 4 días de edad. En este trabajo, no se encontró diferencias significativas en cuanto a motilidad y por lo tanto en fertilidad. También es contradictorio con el trabajo de Martín Rillo (1984) quien menciona que el diluyente MR-A tiene la mejor formulación con excelentes resultados de fertilidad a lo largo de 6 días de almacenamiento de semen. En contraste, Laforest y Allard (1996) mencionan que el diluyente Modena fue consistentemente mejor en el porcentaje de motilidad que el diluyente MR-A, lo cual es similar al presente trabajo ya que el diluyente Modena tuvo un mejor porcentaje de motilidad durante todo el periodo de almacenamiento. En el presente trabajo, se observó que la motilidad en ambos

diluyentes (Modena y MR-A) disminuyo significativamente después de las 56 horas de almacenamiento. En apoyo a esta observación, Pedersen (1996) encontró que el semen de verraco disminuye su motilidad significativamente después de las 72 horas de almacenamiento. Estas observaciones corroboran que el semen de cerdo solo puede utilizarse dentro de unos pocos días de edad con características aceptables de motilidad, independientemente del diluyente empleado.

En otro trabajo Meding (1992) comparó la motilidad de los espermatozoides de verraco diluidos en ocho diferentes diluyentes almacenados a 38°C por 80 horas encontrando que el diluyente Kiev presentaba los mejores resultados aunque no menciona los demás diluyentes utilizados.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el diluyente Modena presentó mayor porcentaje de motilidad a 15°C que el diluyente MR-A. En coincidencia, Park et al. (1996) mencionan resultados similares: el diluyente Butschwiller (similar al diluyente Modena) fue mejor que el MR-A en cuanto a motilidad a una temperatura de 18°C. Laforet y Allard (1996) también reportan que el diluyente Modena fue consistentemente mejor en porcentaje de motilidad y porcentaje de células vivas que el diluyente MR-A a 18°C.

En otro trabajo Pursel, (1988) comparó la motilidad de los espermatozoides de verraco en los diluyentes: BTS, BL-1, Kiev y Modena a tres diferentes temperaturas (15, 19 y 23°C) en un periodo de almacenamiento de 7 días. Pursel encontró que el diluyente BTS mantuvo mejores porcentajes de motilidad a 23°C que a 15 y 19°C donde los resultados fueron similares para el resto de los diluyentes incluido el diluyente Modena.

En lo que se refiere a la viabilidad, en el presente trabajo no se encontró diferencias significativas entre el diluyente Modena y el diluyente MR-A durante todo el periodo de almacenamiento (72 horas). Esto es contradictorio a lo reportado por Laforest y Allard (1996) que mencionan que el diluyente Modena presento consistentemente mejor porcentaje de células vivas que el diluyente MR-A durante 7 días de almacenamiento. Estos autores, atribuyen estos resultados a la diferencia en osmolaridad del diluyente Modena en relación a los demás (240 mOsm vs 290-330 mOsm respectivamente).

En otros trabajos, Korniewicz et al. (1996) utilizaron semen de verraco en cinco diluyentes diferentes para comparar viabilidad y capacidad fertilizadora y encontraron que los espermatozoides diluidos en los diluyentes MR-A y Androhep presentaron los más altos porcentajes de viabilidad, y el diluyente Kiev como el más bajo en cuanto a porcentaje de viabilidad; por otro lado, Buyan et al, (1989) evaluaron 48 eyaculados de verracos los cuales fueron diluidos en los diluyentes: Kiev, GPS-1 y BL-1, almacenados durante 48 horas; para los tres diluyentes los resultados de porcentaje de viabilidad fueron: 66.3, 65.7 y 62.7% respectivamente. Mientras que en este trabajo se evaluaron 30 eyaculados de verracos diluidos en los diluyentes Modena y MR-A que para las 48 horas de almacenamiento presentaban unos porcentajes de viabilidad de 85.3 y 85.1% respectivamente.

En cuanto a la morfología normal, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas; esta observación esta de acuerdo con lo reportado por Rillo (1984), quien afirma que los diluyentes empleados no afectan la morfología normal de los espermatozoides. Sin embargo, si consideramos el acrosoma de forma separada a la morfología del resto del espermatozoide, el efecto del

diluyente sí queda manifiesto. En este sentido, Laforest y Allard (1996) informan que el diluyente Modena produjo menor daño acrosomal que el resto de los diluyentes probados, incluido el diluyente MR-A.

Los eyaculados diluidos con diluyente Modena o MR-A pueden ser utilizados a los 3-4 días después de ser obtenidos para Inseminación Artificial obteniendo buenos resultados de fertilidad (Johnson, 1988), lo cual coincide con los resultados que obtuvieron otros investigadores donde encontraron que las cerdas pueden ser inseminadas con semen de 80 horas de almacenamiento en diluyente Modena o MR-A obteniendo buenos resultados de fertilidad (Sone, M. 1989).



## **8.- CONCLUSIONES**

La viabilidad y morfología normal de los espermatozoides no se afectó por el diluyente que se utilizó; pero si por tiempo de almacenamiento.

Las muestras evaluadas se preservaron mejor durante el almacenamiento de 80 horas en el diluyente Modena por presentar una motilidad general espermática más alta.

La motilidad general en el diluyente Modena fue significativamente mayor ( $P < 0.0005$ ) que en el diluyente MR-A, en cualquier tiempo de muestreo.

El momento en que ocurre el mayor deterioro de motilidad general, viabilidad y morfología normal del semen tanto en diluyente Modena como en el diluyente MR-A es después de las 56 horas de acuerdo como lo muestran las gráficas de tiempo.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Barth, A.D. y Oko, R.J. 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press, USA.
2. Dirksen, G, 1991. Long-term use of fresh boar semen with special refernces to length of storage, diluents and A.I boar. Thesis, Tierarztliche Hochschule Hannover.
3. Duran del Campo, 1980. Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Edit. Hemisferio Sur. Uruguay. 264 p.
4. Flores, J:A, 1983. Ganado Porcino. Editorial Limusa, 3ª. Edición. México D.F.
5. Forsberg , M. and, Ropstand, E. 2000. Research and Practice II. Animal Reproduction Science. Supplement 1. 384 p.
6. Gordon, I. 1997. Reproducción Controlada del Cerdo. Editorial Acribia. Zaragoza, Esp. 267 pag.
7. Hafez, E.S, 1991. Reproduction in farm animales. Editorial Interamericana S.A., 5ª. Edición. México D.F.
8. Kato, S., Terayama, K., 1981. Successful pregnancy using boar spermatozoa stored at 4° C for 12 days. Pig News and information.
9. Johnson, L.A. and Rath, D., 1990. Proceedings of the Second International Conference on Boar Semen Preservation held at Beltsville, MD, USA, August 1990. Reproduction in Domestic Animals, Supplement 1.
10. Johnson, L.A., Fiser, P. and Maxwell, M.C. 2000. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science. 62: 143-172.
11. Juergenson, D. y Elwood, M., 1977. Producción Porcina. Editorial Herrero Hermanos S.A., 1ª Edición. México.D.F.
12. Laforest, J.P. and Allard, D. 1996. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. Reproduction in Domestic Animals. 31 (1) 275-276 p.
13. Lievano, J.R, 1989. Cría intensiva de cerdos comerciales. Editorial Limusa, 1ª edición. México D.F.
14. Martín R.; Alias S., Díaz E., Pérez C, 1980. Congelación de semen de verraco. IX congreso Internacional de Reproducción Animal. Madrid, España.

LISTA DE REFERENCIAS

15. Martín, R. S., 1982. Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Editorial Aedos, 1ª. Edición Barcelona, España.
16. Mattew, B. and Smith, L., 2002. Proceedings Annual Conference of the International embryo-transfer Society. Vol. 1 2002.
17. Meding, S., 1992: Effect of duration of storage, diluent, further dilution and semen quality on the fertilizing ability of fresh boar semen. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
18. Mercado, S. J., 1986: Estudio comparativo de tres diluyentes para la conservación de semen de verraco. Tesis de Licenciatura FES Cuautitlan UNAM. Cuautitlan Izcalli, Estado de México.
19. Park, C.S., Cheon, Y.M. and Xu, Z. 1996. Comparison of preservation of liquid boar semen between Lactose-egg yolk and Böttschwiler diluents. *Reproduction in Domestic Animals* 31 (1) 269-270 p.
20. Pedersen, N.P. 1996. Use of different temperatures in boar semen diluents. *Reproduction in Domestic Animals*. 31 (1) 277-278 p.
21. Rath, D., and Johnson, L.A., 1996: Proceedings of the Third International Conference on Boar Semen Preservation held at Mariensee, Germany, August. 1995. *Reproduction Domestic Animal*. Vol. 31 (1) 1-342.
22. Reed, C.B. 1991. Commercial requirements for an effective fresh semen diluent. *Reproduction in Domestic Animals*. Supplement. 1. 254-270 p.
23. Rodríguez Gil, J.E, 1993: Effects of agitation on the quality of stores, refrigerated boar semen. Publicaciones do 5º. Simposio Internacional de Reproducción Animal, Luso, Portugal, volumen II, Setembro-Outubro.
24. Sone, M, 1992: Storage of boar semen in liquid form. *Japanese Journal of Swine Science*, 21: 41-50.
25. Sorensen, A.M., 1991: Reproducción Animal Principios y Practicas. Editorial McGraw Hill. 1ª. Edición. México D.F.
26. Tkachuk, M.N, 1991: Storage of highly diluted boar semen. *Nauch, tekhn. Byull, NII Zhivotnovod. Lesostepi y Poleyá URSS*, 15-19.
27. Weitze, K.F. 1990. Long-term storage of extended boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*. Supplement 1. 231-253 p.

## ESQUEMA 1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### Cuadro 1. Resumen de la secuencia de trabajo

- 1 

Obtención del eyaculado
-------------------------

↓
- 2 

Toma de muestras alicuotas para las determinaciones en el semen fresco
--

↓
- 3 

<b>Dilución 1.</b> 15 ml a $50 \times 10^6$ espermatozoides por ml Diluyente MRA	<b>Dilución 2</b> 15 ml a $50 \times 10^6$ espermatozoides por ml Diluyente Modela
--	--

↓
- 4 

Transporte a la FMVZ
----------------------

↓
- 5 

Toma de muestras alicuotas para las determinaciones en los espermatozoides postransportados
---

↓
- 6 

Toma de muestras alicuotas para las determinaciones en los espermatozoides postdiluidos de la hora 00 hasta la hora 80.
---

## Anexo 1. REACTIVOS

### **Diluyente para semen porcino MR-A**

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidades</i>
Diluyente MR-A	100.0 Gr
Agua bidestilada y desionizada	1000.0 MI

#### *Preparación*

1. Calentar el agua a 38°C.
2. Agregar el diluyente y homogeneizar.
3. Dejar reposar al menos 1 hora antes de su utilizar.

### **Diluyente para semen porcino Modena**

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidades</i>
Diluyente Modela	150.0 Gr
Agua bidestilada y desionizada	1000.0 MI

#### *Preparación*

1. Calentar el agua a 38°C.
2. Agregar el diluyente y homogeneizar.
3. Dejar reposar al menos 1 hora antes de su utilizar.

### **Colorante Rosa de Bengala**

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidades</i>
Colorante Rosa de Bengala	0.2 Gr
Fomaldehido	10.0 MI
Aforar en agua destilada a	100.0 MI

### **Colorante Eosina Nigrosina (Barth y Oko, 1989)**

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidades</i>
Solución isotónica de citrato de Na	90 mM
Eosina amarillenta	4%
Nigrosina soluble en H <sub>2</sub> O	10%

### **Preparación**

1. Mezclar la solución de citrato de sodio y la eosina amarillenta.
2. Filtrar la mezcla y almacenar.
3. Mezclar la solución de citrato de sodio y la nigrosina soluble.
4. Filtrar la mezcla y almacenar.
5. Mezclar ambas soluciones en proporciones iguales.