



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACION DE TRES TIPOS DE DILUYENTES
SEMINALES Y SU CAPACIDAD PARA MANTENER
LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN CONEJOS DE
RAZA CHINCHILLA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:

SERGIO GRANADOS PALMA

ASESOR:

M. en C. MARIA MAGDALENA ZAMORA FONSECA

COASESOR:

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2006.



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 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.

DEDICATORIAS

❖ **A mis padres:**

Por todo el cariño, el sustento
y los incondicionales sacrificios
(Leonor y Pablo)

❖ **A mis hermanos:**

Por su buen ejemplo
y el tiempo compartido
(Alejandro, Teresa, Pablo, Ángeles, Clara,
Silvia, Juana, Carlos y Ricardo)

❖ **A mi esposa:**

Por seis años de feliz matrimonio llenos
de amor, respeto, confianza y fe en mi
(Laura)

❖ **A mi hija:**

Por su inocencia y contagiosa alegría que
me hacen olvidar cualquier vicisitud
(Karen Aide)

❖ **A mi mejor amigo:**

Por sus consejos palabras de
aliento y diarias oraciones
(Carlitos)

AGRADECIMIENTOS

❖ **A mis maestros:**

Por su amplia experiencia, entrega y profesionalismo

❖ **A la Universidad Nacional Autónoma de México:**

Por la formación brindada a través de sus Invaluables recursos humanos y materiales

❖ **A mis asesores:**

Por sus conocimientos, dirección e infinita paciencia
(Magdalena y José Alfredo)

❖ **A los técnicos:**

Por la ayuda y el apoyo prestado en la fase experimental
(Chava y Esther)

❖ **A El Jurado:**

Por su colaboración y amable disponibilidad
(Marco Antonio, Magdalena, Consuelo, Rosario y Elisa)

❖ **A las empresas donde he laborado:**

Por permitirme ganar el sustento de cada día
(Teleforma, Super Lechería y Wal Mart)

❖ **A la Sociedad:**

Por los retos y compromisos que sirven de estímulos para seguir esforzándome

❖ **A DIOS:**

Por la vida y todo lo que hay en ella

INDICE

| | |
|--|----|
| Índice | 2 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Revisión de literatura | 8 |
| Generalidades | 8 |
| Anatomía y Fisiología de conejo macho | 8 |
| Objetivos..... | 12 |
| Hipótesis..... | 13 |
| Material y Métodos | 14 |
| Recolección de Semen..... | 17 |
| Valoración del eyaculado..... | 18 |
| Diluyentes | 18 |
| Prueba de tinción y determinación de concentración | 16 |
| Resultados..... | 22 |
| Discusión | 28 |
| Conclusiones | 30 |
| Bibliografía..... | 31 |
| Anexos..... | 33 |

ÍNDICE DE CUADROS TABLAS FIGURAS Y GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| Glándulas accesorias a genitales de conejo..... | 8 |
| Rango de los parámetros según bibliografía | 9 |
| Análisis químico proximal de alimento..... | 14 |
| Esquema de secuencia de pasos en el experimento | 16 |
| Vagina artificial | 17 |
| Componentes de diluyente Viudes | 19 |
| Componentes del diluyente BTS | 19 |
| Componentes de leche semidescremada..... | 19 |
| Tinción eosina-nigrosina..... | 20 |
| Cámara de Neubauer | 21 |
| Cuadro 1. Identificación de conejos número de eyaculados y volúmenes..... | 22 |
| Cuadro 2 Volumen de cada eyaculado y sus promedios..... | 22 |
| Cuadro 3. Mezclas de semen (pools) realizadas y sus parámetros | 23 |
| Figura 1 Gráfica de motilidad general..... | 24 |
| Figura 2 Gráfica de vivos general..... | 25 |
| Figura 3 Gráfica comparativa de motilidad entre diluyentes según el momento..... | 26 |
| Figura 4 Gráfica comparativa de vivos entre diluyentes según el momento..... | 27 |
| Anexo 1. Valores obtenidos de la motilidad con cada diluyente | 34 |
| Anexo 2. Valores obtenidos con la determinación de vivos con cada diluyente | 35 |

RESUMEN

En la presente investigación se comparó la capacidad de tres diluyentes para semen utilizados en conejos para mantener la motilidad de los espermatozoides, siendo la motilidad una medida indirecta de su viabilidad; los machos muestreados pertenecen al lote de sementales del Módulo de Cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán (FES-C) de la UNAM. Se utilizaron 6 sementales de raza Chinchilla. La recolección del semen se hizo por medio de vagina artificial con una frecuencia de tres veces por semana de Septiembre del 2005 a Enero del 2006 los días lunes, miércoles y jueves entre diez y once de la mañana. De las variables que se consideraron, se obtuvieron los siguientes valores promedio: Volumen del eyaculado: 0.95 ml; concentración espermática: 483×10^6 espermatozoides por ml; una motilidad inicial de 89% y 95% vivos según la técnica utilizada eosina-nigrosina. Se llevó a cabo una mezcla (pool) por día el cual se dividía en tres partes iguales para ser diluida cada parte en alguno de los tres diluyentes: 1) Viudes de Castro; 2) BTS (Beltsville Thawing Solution) y Leche semidescremada ultrapasteurizada marca Alpura. Posteriormente, se cuantificó la motilidad individual por medio de microscopía directa y el por ciento de vivos a las 24 y 48 hrs. A los resultados obtenidos se les practicó un análisis de varianza de medidas repetidas. En relación a la motilidad, hubo diferencias en la evaluación a las 24 y 48 horas; la Leche produjo los valores más bajos y el BTS los mejores. En relación a la viabilidad, no hubo diferencias significativas en ningún momento de la evaluación en ninguno de los diluyentes. Al someter los datos a un análisis de varianza, se comparó la variable motilidad entre los tres diluyentes sin tomar en cuenta el momento de conservación. El análisis nos muestra que el diluyente Viudes y el BTS no fueron diferentes entre si ($P > 0.05$); en cambio, la Leche fue diferente a los dos anteriores ($P < 0.0001$). En relación a la comparación de los diluyentes para mantener la motilidad a través del momento de conservación, el análisis de varianza de medidas repetidas nos indica que hubo diferencias significativas entre cada momento de conservación para cada uno de los diluyentes empleados ($P < 0.0001$). En relación a la comparación de los diluyentes para mantener la viabilidad a través del momento de conservación, de acuerdo al análisis de varianza de medidas repetidas, la única diferencia significativa encontrada fue en la Leche al inicio del periodo de conservación en comparación a las 48 horas ($P < 0.03$). En conclusión, la leche semidescremada ultrapasteurizada utilizada como diluyente, comparada con dos diluyentes como el Viudes y el BTS, no es el medio más recomendable ya que aún cuando no existe una diferencia significativa con los otros para mantener vivos a los espermatozoides no les provee las propiedades fisicoquímicas tales como suministro de energéticos y amortiguación de pH para mantener su motilidad, siendo ésta de vital importancia para llevar a cabo la fecundación.

INTRODUCCIÓN

La necesidad básica del humano de alimentarse lo llevó de la cacería de animales a la domesticación de especies como los bovinos, ovinos, porcinos y aves desde la prehistoria. No siendo así la del conejo ya que esta se remonta poco más de un milenio atrás; oriundo del sur de Europa y del norte de África el conejo silvestre *Oryctolagus cuniculus* fue “descubierto “ por los Fenicios cuando establecieron contacto con España hacia el año 1000 a. C. En tiempos de los romanos, el conejo queda como símbolo de España. Parece claro que fueron los romanos quienes diseminaron el conejo por todo el imperio, como animal destinado a la caza. A semejanza de los españoles de esa época consumían al conejo bajo la forma de feto o nonato con el nombre de *laurices*. Los animales no estaban todavía domesticados, sin embargo Varrón (116-27 a.C.) recomienda guardar los conejos en las *leporias*, parques cercados para albergar liebres así como otras especies salvajes destinadas a la captura. Estas *leporias* constituyen el origen de los cotos que se desarrollan después en la edad media, los monjes conservan la costumbre de consumir *laurices* en tiempo de cuaresma por considerarlos un manjar. La conservación de los conejos en un coto se convierte en Francia en un derecho señorial. Se cazaba poco pero se capturaban sobre todo con lazos, redes y trampas. En el siglo XVI aparecen varias razas, primer signo de cría controlada; a finales de mismo siglo se difunde la cría en Francia, Italia, Flandes e Inglaterra. (Lebas, 1996; Camps 2003).

Especie famosa por su prolificidad, el conejo es un herbívoro capaz de aprovechar los forrajes. Cualquier producción de carne tiene como objetivo la transformación de proteínas vegetales, que el hombre consume poco, en proteínas animales de gran valor biológico. En el caso de una producción que utilice el conjunto de los conocimientos adquiridos para la cría de las diferentes especies, se comprueba que el conejo puede transformar el 20% de las proteínas alimenticias que absorbe en carne comestible, el valor calculado para el pollo de carne es de 22-23%, para el cerdo es de 16-18% mientras que para el del bovino es de 8-12%. (Lebas, 1996).

La producción de carne de conejo es una buena alternativa para nuestro país pues requiere poca mano de obra, poco espacio, no se requiere instalaciones especializadas y costosas para tener una buena producción. Una vez instalada la producción con un buen manejo administrativo y la promoción local del consumo de la carne puede dar como resultado una

empresa rentable. Solo se deben vigilar problemas sanitarios, de bioseguridad, planeación de oferta demanda, capacitación de personal, selección de animales con alto valor genético y mercadotecnia (Gonzalez, 2003; Martinez, 2004).

El área reproductiva es un punto que en cualquier producción pecuaria puede significar el éxito o el fracaso de una granja. Por lo tanto los programas reproductivos en las conejas son cada vez más complejos y el uso de la inseminación artificial cada día gana más terreno en la producción de los leporinos, así como las técnicas de inducción de celo e inducción de la ovulación. Esto nos hace pensar que las investigaciones de hace veinte años y hasta nuestros días, están enfocadas a maximizar la productividad de una granja sin perder de vista la calidad del producto final que es la carne obtenida (Lavara y Vicente, 2002; Leyun, 1998; Martín, 2002).

La historia de la raza chinchilla se remonta desde la prehistoria, de este período se encontraron restos fósiles en la Cordillera de los Andes, de un animal llamado Meegamys. Estos restos eran semejantes a los de una chinchilla gigante. Una de las teorías que intenta explicar la peculiar calidad de pelo múltiple de la chinchilla dice que, el animal fue evolucionando hasta quedar reducida al tamaño actual, pero esa reducción no fue acompañada de la correspondiente reducción del número de pelos o fibras, los que se vieron obligados a crecer en una superficie menor. Por ello cada folículo en lugar de tener un pelo como en la mayoría de los mamíferos, contienen muchos más. Si bien esta hipótesis no se ha podido probar, se puede afirmar que el pelo de la chinchilla es una excepción en la naturaleza sólo compartida por las vizcachas, sus parientes más cercanas. Existen diversas teorías con respecto al origen del vocablo Chinchilla, los Quechuas utilizaban la palabra "Chin", significando silencioso, "sinchi" quiere decir fuerte y "lla" es un diminutivo. La unión de estos vocablos sería "silenciosa, fuerte y pequeña". En mapuche, "chilla", significa "Zorro pequeño" Chinchilla es también una pequeña ciudad de la provincia de Albacete en España. Los aborígenes Chibchas proveyeron a los españoles de pieles y lanas, y no se descarta que de allí provenga el vocablo. En 1936 se funda la primera organización que agrupa a criadores de chinchillas de EE (Alejandri, 2005).

En 1972, se formó el Council Chinchilla World (Consejo Mundial de la Chinchilla), cuyo único fin es difundir, promocionar y defender la Industria mundial. Actualmente se explota esta raza tanto por su carne como por su piel en muchos países de los continentes (Alejandri, 2005).

La inseminación artificial en la cría de conejo se ha desarrollado en Europa con gran auge, especialmente en Italia, Francia y España, tan solo en los dos primeros países se practica en alrededor de 1000 criaderos y con tendencia a difundirse, porque permite mejorar la organización del trabajo. La inseminación artificial persigue diversos objetivos, por una parte, un incremento de la productividad en las explotaciones mediante la reducción del número de machos en granja (con el aumento consiguiente del número de hembras) y por otro, la utilización del semen de machos de características deseadas, como por ejemplo una buena velocidad de crecimiento. Paralelamente, se consigue una mejora de la organización de la explotación, aunque ésta también podría obtenerse por el sistema tradicional de monta natural (Viudes-De-Castro Vicente, 2005; Moya, 2002).

El manejo del semen desde su obtención hasta su depósito en el tracto reproductor de la hembra va a repercutir en la fertilidad y la prolificidad y el papel del diluyente es de suma importancia para obtener resultados deseados. El semen puede utilizarse fresco, refrigerado o congelado; los resultados obtenidos mediante inseminación artificial (I.A.) con semen fresco son de un 60-80% de fertilidad, con una prolificidad similar a la de monta natural (7-10 gazapos vivos por parto). Sin embargo, la inseminación artificial en cunicultura se encuentra limitada por la baja relación eyaculado: hembras inseminadas (1:10) y por el tiempo de refrigeración recomendado para el semen (24 horas a 16-18° C.) así como por la tecnología de congelación de semen que en esta especie, por el momento, no ofrece resultados competitivos a nivel de explotación, ya que la motilidad y normalidad acrosómica post-descongelación desciende un 50%, resultando un porcentaje de gestación en torno al 40% y una pérdida de prolificidad alrededor de 2 gazapos. En determinadas líneas y con fines de conservación genética se han obtenido buenos resultados de fertilidad (80%) y prolificidad con semen congelado. (Viudes-De-Castro Vicente, 2005; Rodríguez Alvariño, 1998).

El diluyente ideal debe de tener como objetivo expandir uniformemente el volumen del eyaculado y proveer un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides al suministrarle una fuente energética (glucosa o fructosa), una capacidad amortiguadora del pH, antioxidantes y antibióticos que limiten la proliferación bacteriana y sustancias que protejan a las proteínas estructurales de los cambios de temperatura. Al mismo tiempo, deberá ser de fácil

obtención o fabricación para que su costo sea accesible (Rodríguez de Lara, 2003; Viudes-De-Castro, 2005).

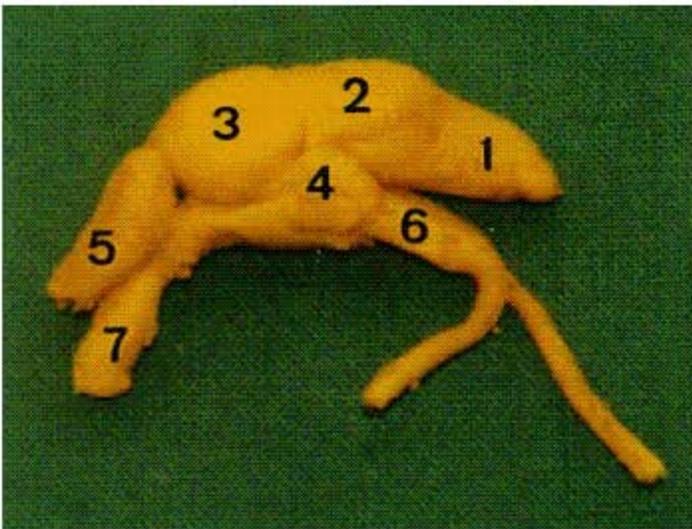
Se han llevado a cabo algunos experimentos sobre inseminación artificial y ha resaltado la dificultad de obtener los resultados que mencionan diferentes autores con respecto a la fertilidad y la prolificidad. Se sugiere que el problema radica en el manejo del semen y la elección del diluyente que juegan un papel relevante para llevar a cabo gestaciones a buen termino.

REVISIÓN DE LITERATURA

GENERALIDADES

ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

Las funciones del aparato reproductor masculino son producir, almacenar y luego transportar al aparato femenino los espermatozoides o células masculinas. Los testículos de forma ovoide están colocados en el escroto que guarda comunicación con la cavidad abdominal, donde se encuentran al nacimiento. Los testículos descienden hacia los dos meses de edad. Después del nacimiento los testículos se desarrollan con mayor lentitud que el resto de los órganos y después experimentan un crecimiento extremadamente rápido a partir de las cinco semanas de edad. Las glándulas anexas presentan un crecimiento del mismo tipo aunque ligeramente escalonado. El pene es corto dirigido oblicuamente hacia atrás, pero se vuelve hacia adelante en el momento de la erección. La espermatogénesis comienza entre los 40 y los 50 días. Los conductos testiculares son activos hacia el día 84 y los primeros espermatozoides aparecen hacia los 110 días. (Sanford, 1988; Lugo, 2004).



Glándulas accesorias del aparato genital del conejo macho. 1. Glándula vesicular; 2. Propróstata; 3. Próstata; 4. Parapróstata; 5. Glándula bulbouretral; 6. Conducto deferente; 7. Uretra. Fijación Bouin.

Tomado de VÁSQUEZ, B. & DEL SOL, M. Complejo prostático en el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *Rev. Chil. Anat.*, 20(2):175-180, 2002.

El plasma seminal es el medio en el que están suspendidos los espermatozoides y lo producen las vesículas seminales. El eyaculado también contiene una sustancia de consistencia gelatinosa la cual sirve para evitar el retroceso y pérdida del semen depositado en la vagina en el momento del salto o monta. (Sanford, 1988; WHO 1999; Castellini and Lattaioli, 1999; Brun, 2002).

Las características seminales están determinadas por varios factores, (raza, alimentación, estado de salud, edad, condiciones de alojamiento, estación del año, frecuencia de recolección etc.) y existe además una amplia variedad de perfiles del semen (La frecuencia de la recolección es un factor que afecta de manera considerable las características seminales. Se recomienda dos eyaculados una vez por semana con 15 minutos de reposo para una buena producción seminal (Bencheikh, 1995; Moce, 2000; Martínez, 1997; Méndez y Ferreiro, 2002).

CARACTERISTICAS PRINCIPALES DEL SEMEN DE CONEJO (Hafez, 2000; Martín, 2002).

| EXAMEN FISICO | VALORES NORMALES |
|----------------------------|---------------------------|
| Color | Blanco |
| Volumen | 0.7-3 ml |
| Examen citológico | |
| Concentración | 100 -1100 millones por ml |
| Motilidad masal | Apreciable con 40x |
| % motilidad individual | 80-100 % |
| % espermatozoides normales | 80-100 % |
| % espermatozoides vivos | 80-100 % |
| % de anomalías primarias | 4-6 % |
| % de anomalías secundarias | 4-6 % |
| Potencial de hidrogeniones | 6.2-7.5 |

La madurez sexual, definida como el momento en que la producción cotidiana de esperma se mantiene, se alcanza en promedio a las 32 semanas (Raza Neozelandesa en clima templado). Sin embargo el macho joven puede utilizarse desde las 20 semanas de edad. Las primeras manifestaciones de conducta sexual aparecen desde los 60 o 70 días; el conejo joven comienza a hacer intentos de monta hacia los 100 días pero, en estas primeras eyaculaciones, la viabilidad de los espermatozoides es escasa o nula por lo tanto es preciso esperar de 135 a 140 días. El volumen del eyaculado va de 0.3 a 2.5 ml. la concentración de $150-1100 \times 10^6$ por mililitro. Las falsas montas 1 o 2 minutos antes del eyaculado aumenta la concentración del

mismo. En el curso de recogidas sucesivas en volumen decrece pero la concentración aumenta. Se puede exigir al macho una eyaculación diaria para una máxima producción espermática con una fertilidad aceptable. Además de las variaciones individuales y entre líneas genéticas, la inmadurez, el calor ambiental (temperaturas superiores a 26-27° C.), la frecuencia de eyaculación (más de 4 eyaculados por semana) y, por supuesto, los problemas patológicos disminuyen la calidad espermática, la cual se evalúa por la disminución de la producción de espermatozoides y el incremento de las anomalías morfológicas (Lugo, 2004; Martínez, 1997).

En general, el calor de los meses de Julio y Agosto, que disminuyen el apetito sexual de los machos y el declive productivo de espermatozoides durante el otoño son los momentos en los que los machos requieren una mayor atención y por ello, para evitar problemas de infertilidad, es necesaria una mejor planificación. (Viudes de Castro, 2005).

Un macho con buena libido puede realizar cinco o más saltos en pocos minutos, pero que por razones obvias estos esfuerzos deben evitarse. El órgano genital del conejo mide en reposo alrededor de dos centímetros pero al entrar en erección esta longitud se duplica. En ese momento se curva hacia delante y abajo, siendo característico de esta especie animal no poseer glándula en la extremidad, en reposo esta protegido por un pliegue de la piel llamado prepucio. (Sanford, 1988).

DILUCIÓN

La dilución del esperma tiene por objeto distribuir el volumen total de la masa espermática en un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides *in vitro*, con el fin de poder, a partir de una sola eyaculación, inseminar el mayor número posible de hembras. En la dilución se ha de tener en cuenta el volumen, el porcentaje de motilidad individual, la calidad y el color. Cada eyaculado proporciona un número de dosis de inseminación determinado, según el volumen y la concentración del eyaculado. La dilución a realizar dependerá de la cantidad de espermatozoides que constituya una dosis de inseminación (6, 16, 30 millones por dosis). Para obtener las dosis de inseminación se deberá tener muy presente la concentración del eyaculado, así como su motilidad y el tiempo que transcurrirá entre la recolección y la

inseminación, con el fin de asegurar una cantidad dada de espermatozoides móviles por dosis de inseminación. (Viudes-De-Castro Vicente J. S; M. P. 2005; Moya, 2002; Alvariño, 2000). Los diluyentes más utilizados actualmente están constituidos por tampones orgánicos como el TRIS. Al tampón se le añade una fuente energética como la glucosa o la fructosa, posiblemente antioxidantes y antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano (500 a 1000 UI de penicilina y 500 a 1000 mg. de estreptomina por mililitro de diluyente). El pH final se ajusta a 6.8-7 y su osmolaridad se sitúa en torno a 290-300 mOsm/kg. Posibilidades actuales de conservación (Quintero, 2003).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar tres diluyentes de semen utilizados en conejos por medio de su capacidad para mantener la motilidad de los espermatozoides como medida indirecta de su viabilidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la motilidad de espermatozoides en muestras de semen recién extraído y comparar sus variaciones una vez diluido con tres diferentes medios cada 24 hrs. durante dos días.
- Evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos y de muertos cada 24 horas durante dos días.
- Cuantificar el tiempo de resistencia de los espermatozoides en distintos medios.
- Asentar un criterio firme para la elección del diluyente más idóneo en el Módulo de Cunicultura.

HIPÓTESIS

Hi. La capacidad de la leche semidescremada ultrapasteurizada para mantener la motilidad de espermatozoides es diferente a la de diluyentes específicos como el Viudes y el BTS.

Ho. La capacidad de la leche semidescremada ultrapasteurizada para mantener la motilidad de espermatozoides no es diferente a la de diluyentes específicos como el Viudes y el BTS.

MATERIAL Y MÉTODOS

La parte práctica de esta tesis se llevó a cabo en el periodo de Septiembre del 2005 a Enero del 2006 y se realizó en el Módulo de Conejos y el Laboratorio de Reproducción e Inseminación Artificial pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán, (FES-C) UNAM. Ésta, se ubica en la carretera Cuautitlán - Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala Municipio de Cuautitlán Izcalli. Esta zona se orienta geográficamente en la siguiente forma: 19 grados 43 minutos longitud norte y 99 grados 14 minutos longitud al poniente, la altitud es de 2250 metros sobre el nivel del mar. Prevalece un clima templado, subhúmedo con lluvias en primavera y verano dando una precipitación anual promedio de 605 mm³ siendo Julio el mes más húmedo con 128.9 mm³ y Febrero el mes más seco con 3.8 mm³ promedio. La temperatura promedio anual de 15.7° C; registrándose en Enero las temperaturas mas bajas con 11.8° C. en promedio y Junio el mes más cálido con una media de 18.3° C (Fuente Estación meteorológica de la FES-Cuautitlán).

Los conejos utilizados, pertenecientes a la raza Chinchilla, son los sementales del módulo de Cunicultura, inicialmente se emplearon seis de los cuales uno fue rechazado y desechado por presentar azoospermia en repetidas muestras. Sus edades oscilaron de entre uno y dos años y medio. Se alimentaron con alimento peletizado de marca comercial cuyo análisis químico proximal se detalla en la siguiente tabla y agua *ad libitum*.

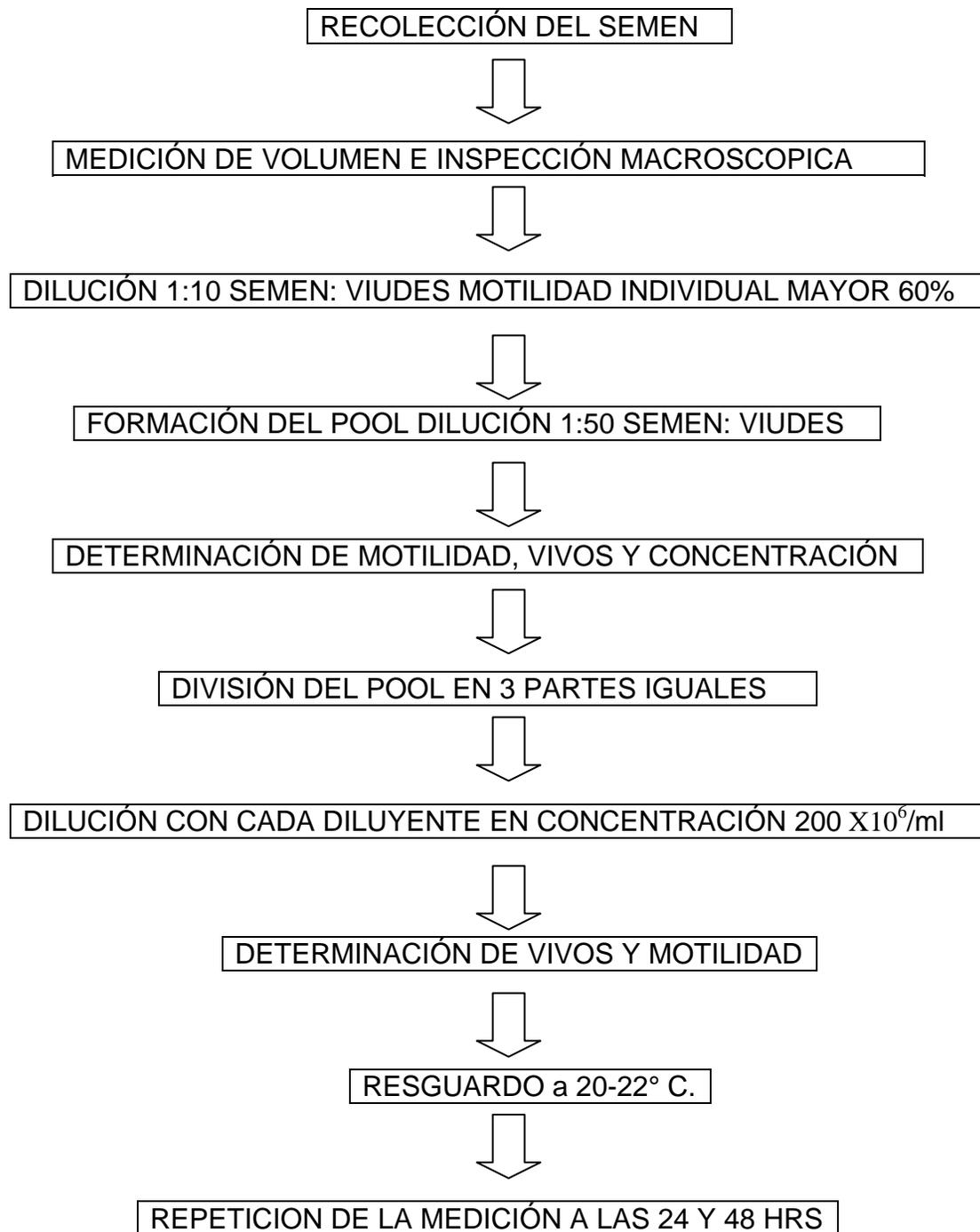
Análisis Químico Proximal del Alimento

| Componente | Porcentaje |
|------------|------------|
| Proteína | 16.5 |
| ELN | 46 |
| Grasas | 2 |
| Agua | 12 |
| Cenizas | 9 |

Se utilizó el siguiente material de laboratorio:

- Microscopio óptico
- Baño María
- Platina térmica
- Recipiente con doble camisa térmica
- Vagina artificial
- Tubos de ensaye recolectores graduados
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pipetas Pasteur con perilla plástica
- Micropipetas
- Termómetro
- 2 Hieleras de poliestireno
- Tinción de Eosina-Nigrosina
- Pipetas y probetas graduadas
- Cámara de Neubauer
- Contadores hematológicos

EN EL SIGUIENTE ESQUEMA SE APRECIA LA SECUENCIA DE PASOS LLEVADOS A CABO EN LA FASE EXPERIMENTAL



RECOLECCIÓN DE SEMEN

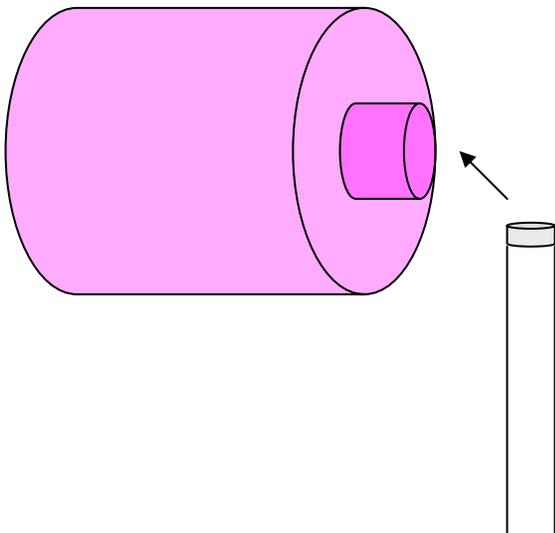
Para la recolección del semen llevado a cabo tres veces por semana (lunes miércoles y jueves antes del medio día), se utilizó el método con vagina artificial la cual consta de las siguientes partes:

- Tubo rígido de plástico con un orificio pequeño y uno grande (7cm. de largo X 5 cm. de diámetro).
- Globo común del número 9
- Cámara llena de agua a 42° C. formada entre el tubo y el globo.
- Tubo colector graduado (de ensaye 5 ml).

Al globo se le corta la punta y se coloca en el interior del tubo, evaginando ambos extremos de tal forma que se forma una cámara aislada en su interior.

En el extremo delgado se coloca el tubo colector como en la figura.

VAGINA ARTIFICIAL



Procedimiento

El macho a muestrear permanecía en su jaula y se le estimulaba con una hembra desde el exterior para después introducir la vagina artificial con la mano cubierta hasta el antebrazo con una piel de conejo previamente impregnada con el aroma de hembra. Una vez obtenido el semen se valoraba macroscópicamente para determinar el color, volumen y que estuviera libre de contaminantes como orina, sangre o materia fecal. Si se detectaba contaminación se desechaba y se obtenía otra muestra.

VALORACIÓN DEL EYACULADO

Una vez obtenido el semen se midió directamente en los tubos recolectores previamente graduados inmediatamente después de la recolección y se colocaron en un termo a 37° C. ya que la evaluación del semen debe proveer información de la capacidad fertilizante de los espermatozoides por medio de los parámetros más importantes como son el número de espermatozoides y su motilidad. Cabe mencionar que la evaluación del semen es tarea complicada porque las diferencias en las metodologías del laboratorio llevan implícitas variaciones sustanciales en los resultados de los parámetros medidos como conteo espermático, motilidad y morfología.

El criterio de aceptación para que el eyaculado fuera utilizado para hacer el pool fue además de estar libre de contaminantes tener una motilidad individual superior al 60% la cual se calculaba por microscopia directa en una dilución uno en diez (semen fresco: Viudes).

DIUYENTE 1: Viudes De Castro

Este diluyente fue desarrollado en el Instituto Valenciano de Investigación Agraria y Tecnología Animal en España, su creación es específicamente para el semen de conejo y ha demostrado ser un medio seguro para la conservación del mismo, pues así lo respaldan diversos estudios donde se han determinado otros parámetros como la crioprotección enriquecido con otros compuestos dando buenos resultados (Viudes de Castro y Vicente, 1996). La elección fue favorecida por la disponibilidad de sus componentes y su costo accesible.

| COMPONENTE | Molar | Peso |
|--------------------------------|---------|----------|
| Tris (Hidroximetilaminometano) | 0.25 M | 3.0285 g |
| Ácido cítrico monohidratado | 0.088 M | 1.8480 g |
| Dextrosa {D(+)-Glucosa} | 0.097 M | 0.8460 g |
| Agua bidestilada | c.b.p. | 100 ml |

DILUYENTE 2: Betsville Thawing Solution (BTS)

Este Segundo diluyente desarrollado en la Universidad de Betsville en Maryland USA. Se ha utilizado con el semen de cerdos y bovinos principalmente.

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|--|----------|
| Dextrosa anhidra | 3.7 g |
| Citrato de sodio dihidratado | 0.6 g |
| Bicarbonato de sodio Na HCO ₃ | 0.125 g |
| Ácido etildiaminotetracético | 0.125 g |
| Cloruro de potasio | 0.075 g |
| Agua bidestilada c.b.p. | 100 ml |

DILUYENTE 3: Leche Semidescremada Ultrapastuerizada Alpura

Es el diluyente que por su accesibilidad se ha utilizado en el módulo con mayor frecuencia para experimentos y tesis, su análisis químico proximal es según el propio fabricante es el siguiente:

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|---------------|-----------------------|
| Carbohidratos | 4.8 g |
| Proteínas | 3.1 g |
| Lípidos | 2.0 g |
| Calcio | 0.11 g |
| Sodio | 0.09 g |
| Vitamina A | 60 ug |
| Vitamina D | 2.4 ug |
| Agua | 95 ml aproximadamente |

PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN DEL SEMEN EN EL LABORATORIO

Una vez medido el volumen de cada muestra libre de contaminantes, se diluía 30 μL de semen en 300 μL de medio Viudes para cuantificar el por ciento de motilidad. Si el porcentaje era superior a 60 se aprobaba para formar la mezcla. De ésta, se obtenía una segunda dilución de 100 μL en 4.9 ml de Viudes (1:50) para cuantificar la motilidad con mayor precisión además de vivos y muertos. De la misma dilución, se tomaba 1 ml y se combinaba con 1 ml de solución de Hancock para obtener 1:100. De esta nueva dilución se calculaba la concentración en la cámara de Neubauer como se describe más adelante.

TREN DE TINCIÓN PARA VIVOS Y MUERTOS

Para valorar la integridad estructural de la membrana plasmática mediante la tinción Eosina-Nigrosina (Eosina 1 g + Nigrosina 8 g, aforado a 100 ml con agua destilada).

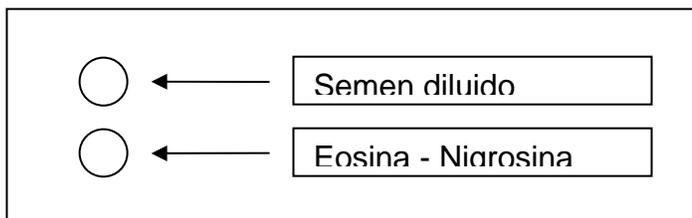
Se coloca una gota de semen diluido en un extremo del portaobjetos

Se le añade una gota del mismo volumen de la tinción Nigrosina-Eosina a la misma temperatura que el semen (32 – 36°C).

Se mezclan ambas gotas y se extienden por toda la superficie del portaobjetos con ayuda de otro portaobjetos

Inmediatamente después, se seca al aire para que se fije.

Con el objetivo 40x se observa al microscopio y se cuentan los espermatozoides vivos (cabeza de color blanco) y los muertos (cuya membrana citoplasmática dañada dejó pasar el colorante y tiñó de un rosa-rojo intenso el interior de la porción cefálica del espermatozoide).

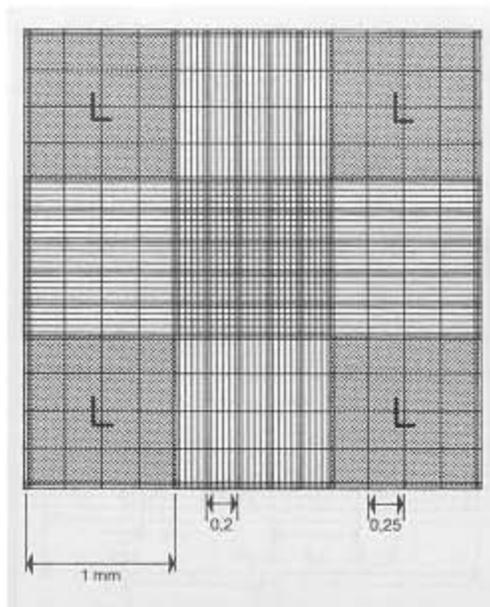


CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

La concentración espermática se refiere al número de espermatozoides contenidos en un mililitro de semen, la determinación de este parámetro se lleva a cabo en la cámara de Neubauer a una muestra previamente diluida.

- a) Con una pipeta se coloca una gota de la solución de semen-Hancock y se permite que se distribuya por capilaridad.
- b) Se repite la operación por el otro lado de la cámara.
- c) Se cuenta con el objetivo 40x los cuadros de los extremos y el central de ambas partes.
- d) El número obtenido es multiplicado por 10 000 000.

CÁMARA DE NEUBAUER



La cámara de Neubauer está dividida en 9 cuadros, éstos a su vez tienen también divisiones en los cuales se pueden contar fácilmente los espermatozoides, generalmente se toman en consideración los cuadros de las esquinas y el central (ver la figura anterior).

RESULTADOS

En el siguiente cuadro se presenta el número de identificación de cada conejo así como el número de eyaculados que se utilizaron en este trabajo.

Cuadro 1. Identificación de cada conejo y número de eyaculados.

| CONEJO | 34 | 48 | 54 | 55 | 56 | 59 | TOTAL |
|------------------------------|----|----|----|----|----|----|-------|
| Numero de muestras aportadas | 14 | 15 | 11 | 4 | 7 | 12 | 63 |

En el siguiente cuadro se presenta el volumen de cada eyaculado de cada conejo así como el valor promedio individual y general.

Cuadro 2. Volumen de cada eyaculado expresado en ml por conejo

| Número de eyaculados | CONEJO | | | | | |
|----------------------|---------|-----|------|------|-----|------|
| | 34 | 48 | 54 | 55 | 56 | 59 |
| 1 | 2.4 | 0.6 | 0.7 | 0.6 | 1.2 | 1.3 |
| 2 | 1.2 | 0.4 | 1.1 | 0.8 | 0.7 | 2.4 |
| 3 | 1.2 | 0.6 | 1.9 | 1.1 | 0.9 | 0.8 |
| 4 | 0.7 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 1.2 | 0.9 |
| 5 | 0.8 | 0.7 | 1.4 | | 0.3 | 2.4 |
| 6 | 1.2 | 0.8 | 0.8 | | 0.7 | 1.2 |
| 7 | 0.7 | 1.1 | 1 | | 1.3 | 1 |
| 8 | 0.9 | 0.8 | 0.6 | | | 1.2 |
| 9 | 0.9 | 1.2 | 0.6 | | | 0.8 |
| 10 | 0.5 | 0.7 | 1 | | | 0.9 |
| 11 | 0.8 | 1.1 | 1.1 | | | 1.1 |
| 12 | 0.4 | 0.7 | | | | 1 |
| 13 | 0.6 | 0.6 | | | | |
| 14 | 0.7 | 1 | | | | |
| 15 | | 0.8 | | | | |
| TOTAL (en ml) | 13 | 12 | 11.1 | 3.3 | 6.3 | 15 |
| PROMEDIO INDIVIDUAL | 0.93 | 0.8 | 1.01 | 0.83 | 0.9 | 1.25 |
| PROMEDIO TOTAL | 0.95 ml | | | | | |

En el siguiente cuadro se presentan las características de las mezclas de semen que se utilizaron en cada día de prueba.

Cuadro 3. Mezclas de semen (Pools) realizadas y sus parámetros

| Número de muestra | Volumen (mL) | Concentración X10 ⁶ por mL | Motilidad % | Vivos % |
|-------------------|--------------|---------------------------------------|-------------|---------|
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 |
| 2 | 1.4 | 440 | 93 | 93 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 |
| 7 | 2.0 | 520 | 88 | 95 |
| 8 | 2.0 | 360 | 86 | 90 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 |
| 13 | 3.0 | 390 | 90 | 94 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 |

En el siguiente cuadro se presentan los valores promedio de las variables examinadas en el semen diluido en cada medio. En relación a la motilidad, hubo diferencias en la evaluación a las 24 y 48 horas; como se puede observar, la Leche produjo los valores más bajos y el BTS los mejores. En relación a la viabilidad, no hubo diferencias significativas en ningún momento de la evaluación en ninguno de los diluyentes.

Cuadro 4. Valores obtenidos de las variables analizadas del semen de conejo diluido con tres medios.

| PARAMETRO | DILUYENTE | INICIAL | 24 HORAS | 48 HORAS | PROMEDIO |
|-----------|-----------|--------------|------------|------------|-------------|
| MOTILIDAD | VIUDES | 89.6 ± 1.00a | 58.1±5.02a | 22.1±4.85a | 55.4±3.62a |
| | BTS | 89.1±1.00a | 68.3±4.44a | 42.5±5.72b | 66.6±3.72a |
| | LECHE | 87.6±1.38a | 13.6±2.33b | 0.1±0.13c | 33.7±1.26b |
| VIVOS | VIUDES | 92.8±1.13a | 88.4±2.13a | 82.8±3.21a | 87.9±2.15a |
| | BTS | 92.8±1.13a | 84.1±4.65a | 79.8±5.50a | 85.6±2.76ab |
| | LECHE | 91.6±1.16a | 76.7±6.48a | 68.2±6.79a | 78.8±3.61b |

Los valores son medias ± error estándar. Letras diferentes en columnas para cada variable indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

Al someter los datos a un análisis de varianza, se comparó la variable motilidad entre los tres diluyentes sin tomar en cuenta el momento de conservación. El análisis nos muestra que el diluyente Viudes y el BTS no fueron diferentes entre si ($P > 0.05$); en cambio, la Leche fue diferente a los dos anteriores ($P < 0.0001$). Figura 1.

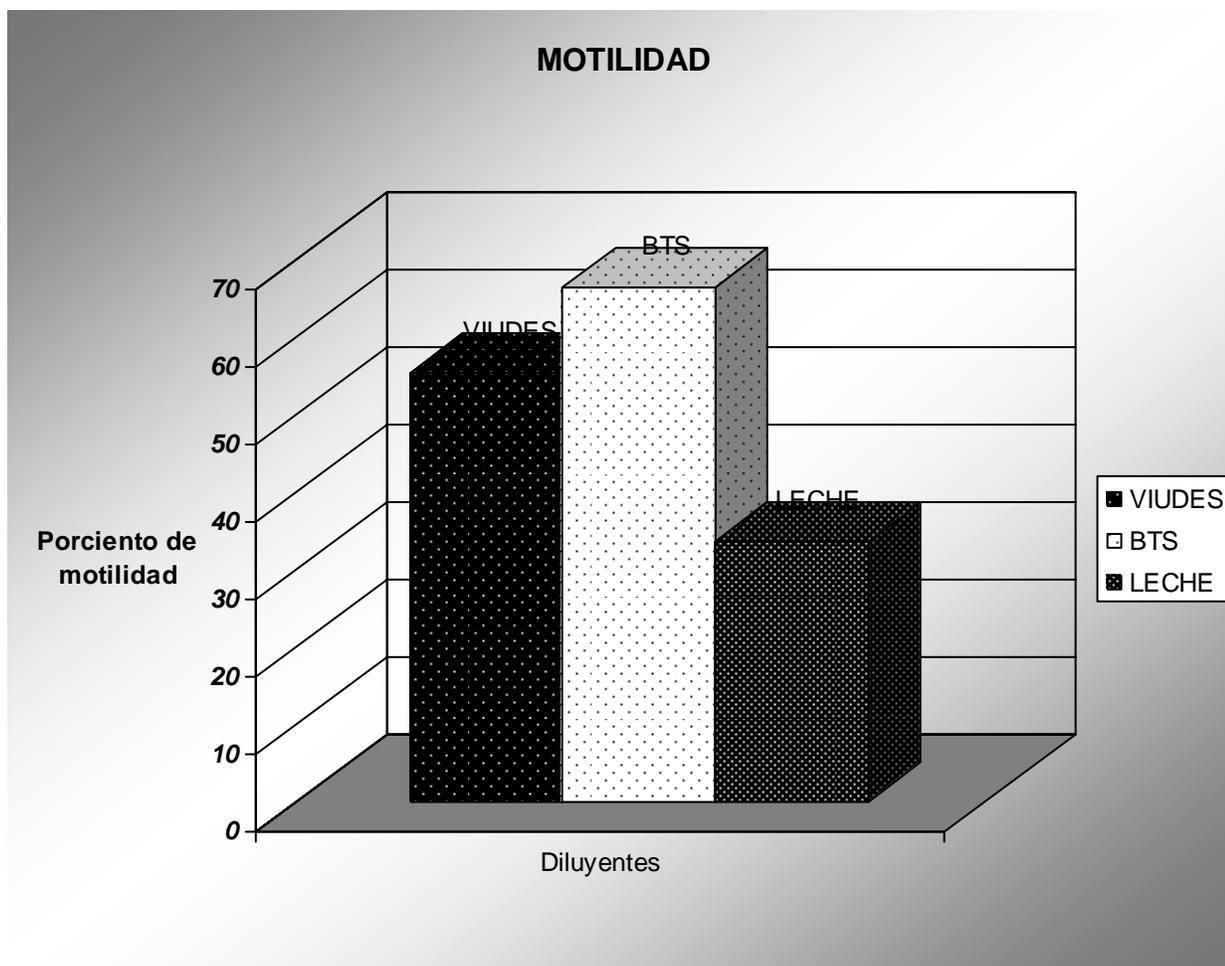


Figura 1. Valor promedio de motilidad para cada diluyente

En relación a la viabilidad, el análisis de varianza nos indica que entre los diluyentes Viudes y BTS no hubo una diferencia significativa, tampoco el BTS con respecto a la Leche, únicamente el Viudes y la Leche fueron diferentes ($P < 0.03$). Figura 2.

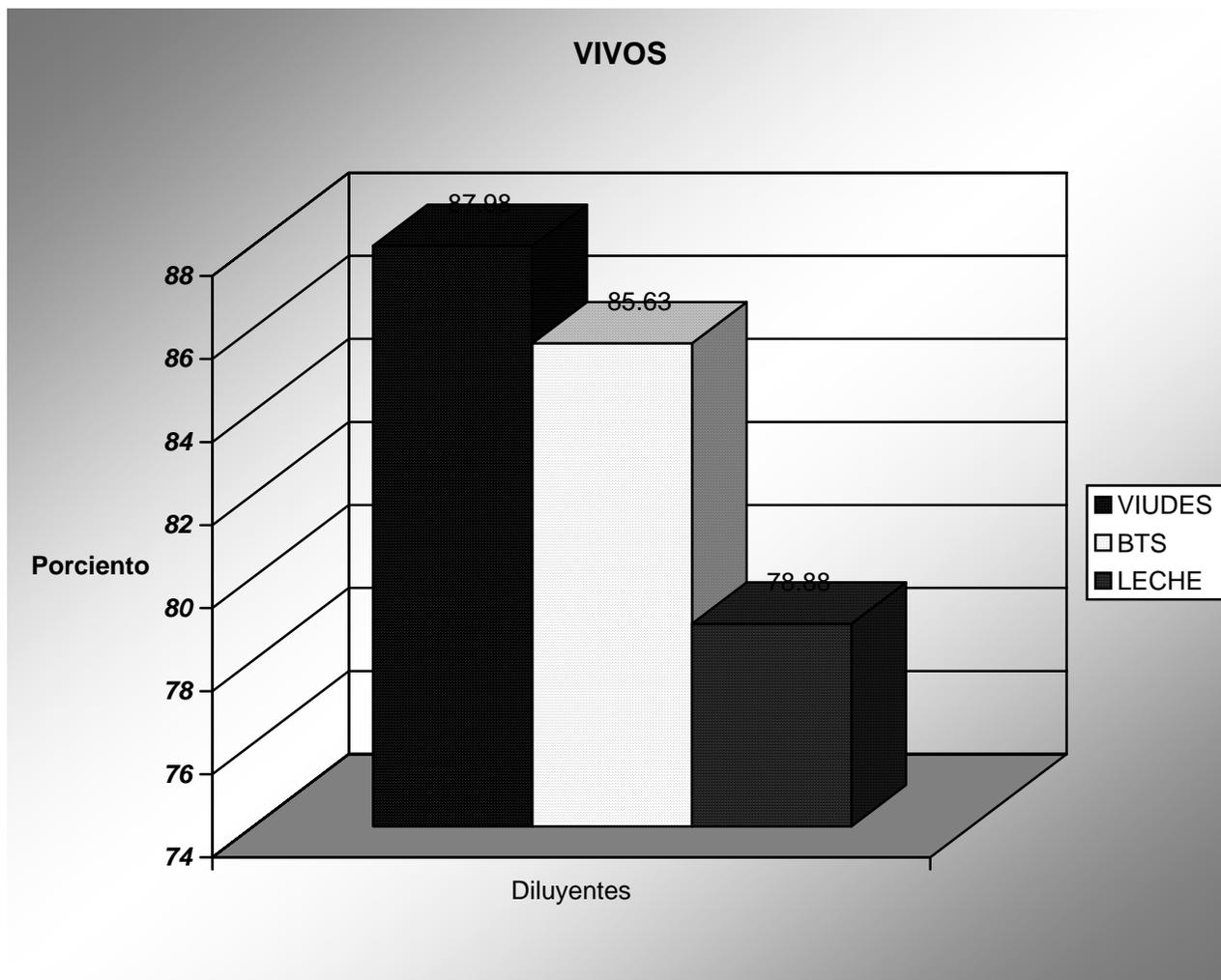


Figura 2. Valor promedio de viabilidad para cada diluyente

En relación a la comparación de los diluyentes para mantener la motilidad a través del momento de conservación, en la Figura 3 se muestra el promedio de la motilidad al inicio del periodo de conservación y sus mediciones a las 24 y 48 horas. El análisis de varianza de medidas repetidas nos indica que hubo diferencias significativas entre cada momento de conservación para cada uno de los diluyentes empleados ($P < 0.0001$).

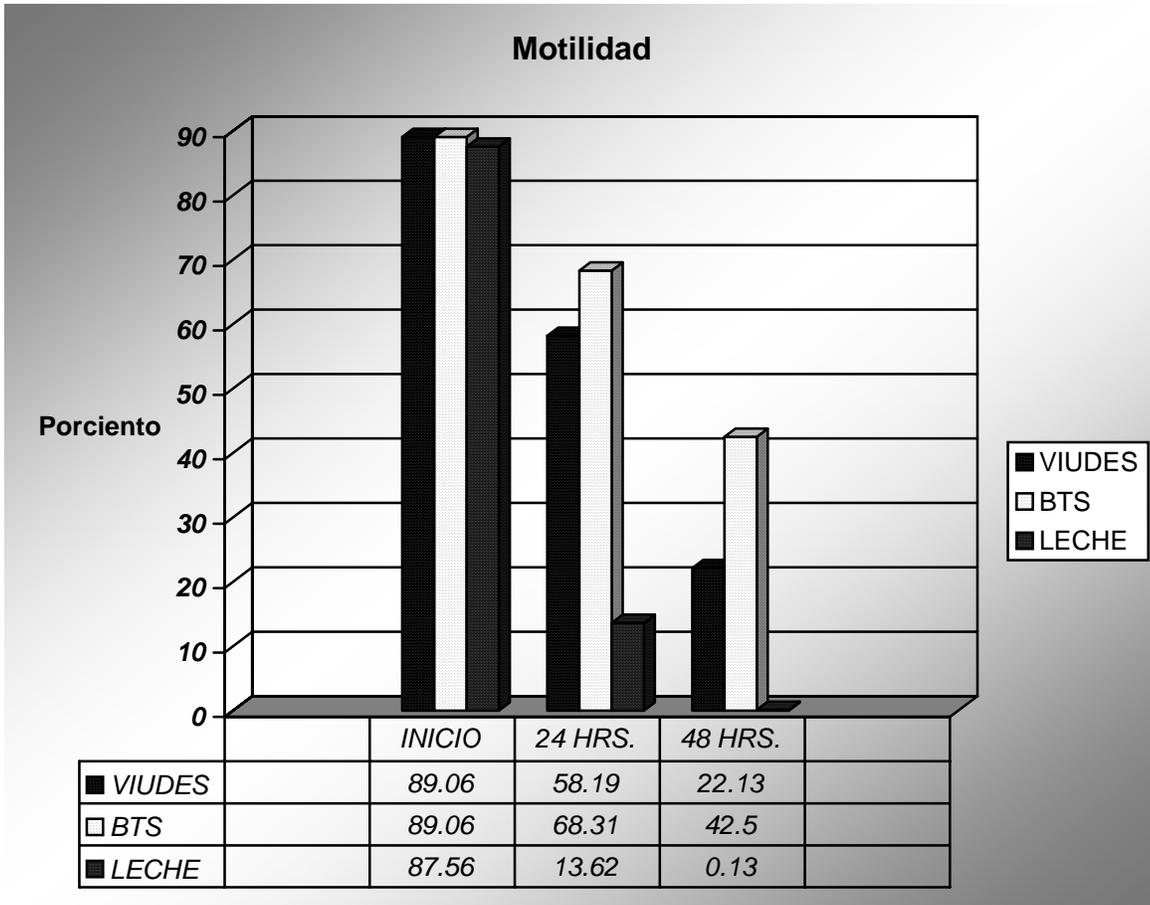


Figura 3. Motilidad de espermatozoides de conejo diluidos en tres diluyentes durante tres momentos de conservación

En relación a la comparación de los diluyentes para mantener la viabilidad a través del momento de conservación, en la Figura 4 se muestran los valores promedio de espermatozoides vivos al inicio del periodo de conservación y sus mediciones a las 24 y 48 horas. De acuerdo al análisis de varianza de medidas repetidas, la única diferencia significativa encontrada fue en la Leche al inicio del periodo de conservación en comparación a las 48 horas ($P < 0.03$).

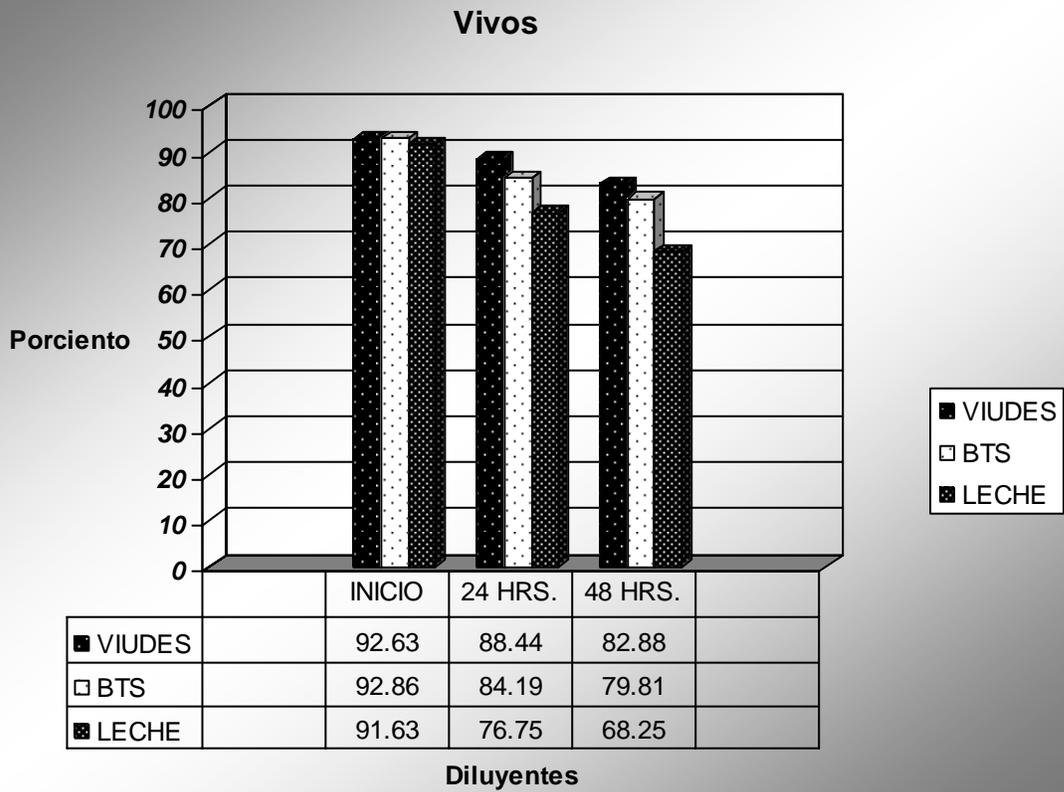


Figura 4. Viabilidad de espermatozoides de conejo diluidos en tres diluyentes durante tres momentos de conservación.

DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se puede apreciar que el diluyente Viudes no demostró poseer una eficiencia superior a la del BTS desarrollado para otra especie. Aunque se debe tomar en cuenta que los artículos publicados por Viudes de Castro y Vicente (2002; 2005) mencionan que la temperatura a la que se utilizó fue de 15°C; por razones técnicas del presente trabajo, esta variable se maneja en un rango de 20 a 22°C. La diferencia de temperatura podría ser una razón ya que ésta funciona como catalizador del metabolismo espermático y agotar así sus reservas energéticas con mayor rapidez. Sin embargo, el diluyente BTS también se utiliza regularmente a temperaturas alrededor de los 17°C para la conservación de semen de cerdo (Johnson *et al.*, 2000) y aún así produjo resultados aceptables en el semen de conejo. Por otro lado, en ensayos iniciales se comprobó que variaciones sutiles en la composición de los medios o la contaminación de los mismos alteraban los resultados en gran medida.

Aunque la composición química de la leche hace suponer que ésta provee a los gametos de nutrientes suficientes para su supervivencia, en este trabajo la leche no fue un medio efectivo para conservar el semen de conejo. Estudios previos, sugieren que la inseminación artificial con semen diluido en leche descremada no produjo resultados aceptables (González, datos no publicados).

Quizá, su alto valor nutritivo y la fácil contaminación bacteriana, con el consiguiente cambio físico químico, sea la causa de su pobre eficiencia como diluyente. Este efecto se minimizó en el presente trabajo porque siempre se utilizó un bote nuevo en cada día de prueba.

Otro factor a tomar en cuenta para explicar estos resultados, es la diferencia entre machos en cuanto a la susceptibilidad de su semen a cada diluyente. Debido a que en este trabajo no se evaluó por separado el semen de cada macho con cada diluyente, no podemos afirmar que el semen de algún macho es más susceptible que el de otros a la leche o a los otros diluyentes; sin embargo, la variabilidad entre machos es un factor muy importante en la conservación de semen (Holt, 2000).

Una observación muy interesante de este trabajo, es que el medio BTS, formulado para la conservación de semen de cerdo, proporcionó las mejores condiciones para la conservación *in vitro* del semen de conejo. Por esto, se sugiere continuar esta línea de trabajo pasando a la inseminación artificial de hembras para comprobar estas observaciones.

CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados y hecho las comparaciones entre los diluyentes, podemos concluir con cierto grado de certeza que:

- 1.- Los valores obtenidos en la medición de la motilidad sí reportan una diferencia significativa entre la leche y los diluyentes Viudes y BTS.
- 2.- La capacidad del diluyente Viudes para mantener vivos a los espermatozoides es similar a la del BTS y éste a su vez es similar a la de la leche pero ésta es inferior a la del primero.
- 3.- Existe evidencia, *in vitro*, de que el diluyente BTS es el idóneo para mantener la motilidad de los espermatozoides.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ALEANDRI FERNANDO 2005. Compendio Actualizado "Cría y Comercialización de la chinchilla", 3º edición Buenos Aires Argentina.
- 2.- CAMPS J. 2003. Evolución del Consumo de la Carne de Conejo. Cunicultura Vol. 28; núm. 162; Barcelona España. Pág. Con. 1-13
- 3.- COSTA P. B. 1998. Cunicultura. Guía de la Cunicultura Española. Vol. 27 Núm. 159 España Pág. Con. 57-103
- 4.- CUNICULTURA. [Http://www.geocities.com/sanfdo/conejo/html](http://www.geocities.com/sanfdo/conejo/html) 2005.
- 5.- GONZALEZ G. J. 2003 Cunicultura Industrial. Desde y Hacia la Bioseguridad. Cunicultura. Vol. 28; Núm. 164 España.
- 6.- HAFEZ, 2000. Reproducción e Inseminación Artificial En Animales. Segunda Edición. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana México.
7. HOLT WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62, 3-22.
8. JOHNSON LA, WEITZE KF, FISER P Y MAXWELL WMC. 2000. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science 62, 143-172.
- 9.- LAVARA Y VICENTE J. S. 2002. Estado Actual De La Reproducción En Cunicultura Universidad Politécnica De Valencia. Departamento De Ciencia Animal. Laboratorio De Biotecnología De La Reproducción Valencia España
- 10.- LEBAS F. COUDER P. 1996. El Conejo Cría y Patología; Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación; Colección FAO; Producción y Sanidad Animal No. 19 Roma Italia.
- 11.- LEACH MICHAEL; 1989 The rabbit. Ed. Shire Natural History Great Britain. 1-24.
- 12.- LEYUN I. M. 1998 Estudio Económico Comparado De La Monta Natural Y De La Inseminación Artificial En Banda Única Cunicultura, Vol. 22; Núm. 126 Navarra España Pág. Con. 65-70.
- 13.- LUGO. 2004. La Fertilidad De Semen De Conejo y los Factores Que Determinan Su Uso. XXXIX Simposio de Cunicultura de ASESCU. Pág. Con. 114-117.
- 14.- MARTÍN, M. 2002 Reproducción De La Coneja Anatomía Y Fisiología Cunicultura; Vol. 25; Núm. 160, Zaragoza España Pág. Con. 318-407

- 15.- MARTÍNEZ, de la C. J.; 2004. "Evaluación De Las Características Seminales Y Su Relación Con La Productividad En Los Sementales Del Módulo De Conejos" FES Cuautilán UNAM. México Tesis Licenciatura.
- 16.- MARTÍNEZ M. S. 1997 Manejo Reproductivo del Macho. Producción y Calidad Seminal. Cunicultura; Vol. 22; Núm. 125; Murcia España. Pág. Con. 34-46
- 17.- MÉNDEZ R; FERREIRO M. 2002. Diagnostico Preliminar De La Fertilidad De Sementales Cunicolas Del Órgano De La Base ACPA En Sancti Spiritus. 2ª Congreso De Cunicultura De Las Americas. Asociación Cubana De Producción Animal. Cuba Pág. Con. 286-289.
- 18.- MOYA A. C. R.; 2002. Introducción De La Tecnología De Inseminación Artificial En La Cunicultura Comercial Cubana; 2º Congreso De Cunicultura De Las Americas. Centro De Investigaciones Para El Mejoramiento Animal. La Habana Cuba Pág. Con. 297-300.
- 19.- QUINTERO MORENO ARMANDO. 2003. Tesis Doctoral "Estudio Sobre La Dinámica De Poblaciones Espermática En Semen De Caballo Cerdo Y Conejo" Universidad Autónoma de Barcelona. España http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVALIABLE/TDX-0220104-14916/aqmlidel.pdf
- 20.- RODRÍGUEZ ALVARIÑO MARIO. 1998. Inseminación Artificial Como Base De La Cunicultura Industrial. Publicaciones Ovejero León España Pág. Con. 29-42.
- 21.- RODRÍGUEZ ALVARIÑO MARIO. 1993 Control De La Reproducción En El Conejo. Mundiprensa Madrid España. Cap. 5 Pág. Con. 65-83.
- 22.- RODRÍGUEZ DE LARA RAYMUNDO. 2003. Recomendación Práctica De La Inseminación Artificial Aplicada A Granjas Comerciales. Universidad Autónoma De Chapingo. México.
- 23.- UBEA J. M. 2002. Manual Técnico De La Inseminación Artificial En Cunicultura Editorial Megaport Zaragoza España.
- 24.- VÁSQUEZ, B. & DEL SOL, M. Complejo Prostático En El Conejo (*Oryctolagus Cuniculus*). *Rev. Chil. Anat.*, 20(2):175-180, 2002.
- 25.- VIUDES-DE-CASTRO M. P. y VICENTE J. S. 2005 Manejo Reproductivo en el conejo. Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Departamento de Ciencia Animal Universidad Politécnica de Valencia, España.

ANEXOS

Anexo 1. TABLA DE MOTILIDAD CON CADA DILUYENTE

| POOL | VOL | CONC | MOT | VIVOS | DILUYENTE | MOT INIC | MOT 24h | MOT 48 h |
|------|-----|------|-----|-------|-----------|----------|---------|----------|
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 | VIUDES | 95 | 49 | 15 |
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 | BTS | 87 | 89 | 83 |
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 | LECHE | 85 | 10 | 0 |
| 2 | 1.4 | 440 | 88 | 93 | VIUDES | 90 | 46 | 11 |
| 2 | 1.4 | 440 | 88 | 93 | BTS | 91 | 16 | 0 |
| 2 | 1.4 | 440 | 88 | 93 | LECHE | 87 | 0 | 0 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 | VIUDES | 91 | 46 | 11 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 | BTS | 95 | 92 | 83 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 | LECHE | 96 | 0 | 0 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 | VIUDES | 87 | 25 | 0 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 | BTS | 91 | 44 | 20 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 | LECHE | 84 | 3 | 0 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 | VIUDES | 86 | 91 | 84 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 | BTS | 84 | 66 | 70 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 | LECHE | 80 | 10 | 0 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 | VIUDES | 93 | 60 | 15 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 | BTS | 95 | 73 | 28 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 | LECHE | 91 | 15 | 0 |
| 7 | 2 | 520 | 88 | 95 | VIUDES | 93 | 57 | 11 |
| 7 | 2 | 520 | 88 | 95 | BTS | 95 | 76 | 28 |
| 7 | 2 | 520 | 88 | 95 | LECHE | 92 | 23 | 2 |
| 8 | 2 | 360 | 86 | 90 | VIUDES | 87 | 86 | 45 |
| 8 | 2 | 360 | 86 | 90 | BTS | 86 | 32 | 11 |
| 8 | 2 | 360 | 86 | 90 | LECHE | 89 | 18 | 0 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 | VIUDES | 95 | 80 | 29 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 | BTS | 94 | 86 | 63 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 | LECHE | 96 | 33 | 0 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 | VIUDES | 82 | 48 | 16 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 | BTS | 85 | 44 | 34 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 | LECHE | 77 | 16 | 0 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 | VIUDES | 85 | 53 | 26 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 | BTS | 83 | 71 | 43 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 | LECHE | 79 | 25 | 0 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 | VIUDES | 85 | 65 | 24 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 | BTS | 87 | 84 | 57 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 | LECHE | 88 | 5 | 0 |
| 13 | 3 | 390 | 90 | 94 | VIUDES | 89 | 19 | 13 |
| 13 | 3 | 390 | 90 | 94 | BTS | 88 | 73 | 41 |
| 13 | 3 | 390 | 90 | 94 | LECHE | 89 | 12 | 0 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 | VIUDES | 89 | 64 | 25 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 | BTS | 88 | 72 | 31 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 | LECHE | 88 | 11 | 0 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 | VIUDES | 93 | 62 | 12 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 | BTS | 89 | 76 | 35 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 | LECHE | 91 | 14 | 0 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 | VIUDES | 85 | 80 | 17 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 | BTS | 87 | 69 | 42 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 | LECHE | 89 | 23 | 0 |

Anexo 2 Tabla con los resultados de % de vivos con cada diluyente

| POOL | VOL | CONC | MOT | VIVOS | DILUYENTE | VIV INIC | VIV 24 h | VIV 48 h |
|------|-----|------|-----|-------|-----------|----------|----------|----------|
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 | VIUDES | 99 | 96 | 90 |
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 | BTS | 94 | 92 | 88 |
| 1 | 1.6 | 450 | 96 | 98 | LECHE | 91 | 90 | 82 |
| 2 | 1.4 | 440 | 88 | 93 | VIUDES | 93 | 63 | 58 |
| 2 | 1.4 | 440 | 88 | 93 | BTS | 94 | 37 | 21 |
| 2 | 1.4 | 440 | 88 | 93 | LECHE | 93 | 6 | 0 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 | VIUDES | 93 | 93 | 84 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 | BTS | 97 | 98 | 95 |
| 3 | 0.9 | 830 | 89 | 95 | LECHE | 95 | 92 | 83 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 | VIUDES | 94 | 89 | 83 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 | BTS | 92 | 81 | 83 |
| 4 | 2.1 | 840 | 92 | 97 | LECHE | 85 | 57 | 41 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 | VIUDES | 92 | 89 | 87 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 | BTS | 88 | 76 | 74 |
| 5 | 2.2 | 460 | 90 | 97 | LECHE | 86 | 71 | 41 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 | VIUDES | 96 | 92 | 90 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 | BTS | 99 | 95 | 92 |
| 6 | 3.1 | 290 | 87 | 97 | LECHE | 95 | 94 | 85 |
| 7 | 2 | 520 | 88 | 95 | VIUDES | 94 | 90 | 91 |
| 7 | 2 | 520 | 88 | 95 | BTS | 97 | 95 | 93 |
| 7 | 2 | 520 | 88 | 95 | LECHE | 98 | 92 | 90 |
| 8 | 2 | 360 | 86 | 90 | VIUDES | 79 | 75 | 48 |
| 8 | 2 | 360 | 86 | 90 | BTS | 82 | 41 | 30 |
| 8 | 2 | 360 | 86 | 90 | LECHE | 85 | 30 | 25 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 | VIUDES | 95 | 96 | 94 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 | BTS | 97 | 95 | 90 |
| 9 | 3.1 | 430 | 97 | 98 | LECHE | 97 | 95 | 89 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 | VIUDES | 88 | 85 | 74 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 | BTS | 87 | 83 | 80 |
| 10 | 3.2 | 490 | 88 | 92 | LECHE | 84 | 64 | 60 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 | VIUDES | 87 | 85 | 79 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 | BTS | 90 | 92 | 85 |
| 11 | 2.7 | 620 | 85 | 93 | LECHE | 89 | 84 | 79 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 | VIUDES | 93 | 94 | 88 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 | BTS | 95 | 91 | 85 |
| 12 | 2.8 | 430 | 89 | 94 | LECHE | 92 | 93 | 80 |
| 13 | 3 | 390 | 90 | 94 | VIUDES | 96 | 93 | 90 |
| 13 | 3 | 390 | 90 | 94 | BTS | 90 | 96 | 94 |
| 13 | 3 | 390 | 90 | 94 | LECHE | 95 | 88 | 93 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 | VIUDES | 94 | 93 | 92 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 | BTS | 97 | 93 | 94 |
| 14 | 2.7 | 390 | 90 | 96 | LECHE | 95 | 90 | 81 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 | VIUDES | 95 | 92 | 90 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 | BTS | 94 | 90 | 84 |
| 15 | 2.1 | 320 | 92 | 97 | LECHE | 96 | 91 | 82 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 | VIUDES | 94 | 90 | 88 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 | BTS | 93 | 92 | 89 |
| 16 | 2.5 | 470 | 92 | 94 | LECHE | 90 | 91 | 81 |