

TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOTILIDAD,
ANORMALIDADES Y DAÑO ACROSOMAL EN SEMEN DILUIDO
DE VERRACO, EMPLEANDO DOS DIFERENTES TIPOS DE
DILUYENTE DE LARGA DURACIÓN.**

POR

EMMANUEL RODRÍGUEZ JIMÉNEZ.

MCV. GERARDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ.

MC. SUSANA ESPINOSA HERNÁNDEZ.



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores MVZ MCV Gerardo Ramírez Hernández y MVZ MC Susana Espinosa Hernández, por su apoyo, paciencia y comprensión para realizar este proyecto.

A mis padres por darme la vida, por su infinito amor, por su apoyo y comprensión, por su ejemplo de tenacidad, valor y coraje al afrontar la vida, por mostrarme que el perseverar es el medio para lograr cumplir mis sueños...los amo.

A Humberto Ibarra González por ser y estar en todo momento, por escucharme y apoyarme, gracias por ser mi mejor amigo.

A Gisela Hernández Solís, por todos los momentos, por compartir tu vida, por hacerme sentir, por escucharme, por apoyarme, por hacerme creer de nuevo en el querer, por hacerme feliz, gracias por existir en mi tiempo y mi espacio.

A todos y cada uno de mis amigos por brindarme su cariño y amistad, mil gracias por todos los momentos que hemos compartido juntos.

CONTENIDO

INDICE	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPOTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	28
LITERATURA CITADA	29
ANEXOS	34

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

1. Clasificación de motilidad espermática individual	5
2. Clasificación de anomalías espermáticas.	14
3. Clasificación de motilidad espermática individual	16
4. Volumen de los eyaculados obtenidos por semental.	20
5. Temperatura de los eyaculados obtenidos por semental al momento de la colecta.	21
6. Porcentaje de motilidad espermática por semental al Momento de la colecta (día cero).	21
7. Comparación de los diluyentes MR-A® y XT-R® sobre las características evaluadas.	22
8. Porcentaje promedio de anomalías morfológicas secundarias durante el periodo de almacenamiento de los espermatozoides en los diluyentes MR-A® y XT-R®.	23
9. Porcentaje de anomalías morfológicas espermáticas secundarias entre los diluyentes MR-A® y XT-R® a los días 1,3,5 y 7 de almacenamiento.	24

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

1. Diluyente MR-A ® presentación en polvo para 1L de agua tridestilada. **18**
2. Diluyente XT-R® presentación en polvo para 1L de agua tridestilada. **18**
3. La imagen muestra en el extremo izquierdo un espermatozoide con flagelo en forma de oville. **22**
4. Anormalidad espermática con flagelo en forma de oville. **22**
5. Espermatozoide que presenta flagelo en forma de látigo. **23**

LISTA DE GRÁFICAS

PÁGINA

1. Comparación del porcentaje de anomalías espermáticas entre los diluyentes MR-A® y XT-R® a 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento.

24

RESUMEN

Rodríguez Jiménez Emmanuel. Comparación de las características de motilidad, anormalidades y daño acrosomal en semen diluido de verraco, empleando dos diferentes tipos de diluyentes de larga duración, en una granja de ciclo completo ubicada en el Estado de Puebla. Bajo la asesoría del M.C.V. Gerardo Ramírez Hernández y la M.C. Susana Espinosa Hernández.

El objetivo de este trabajo fue comparar las características de motilidad, anormalidades morfológicas y daño acrosomal en el semen diluido de verraco, utilizando dos diferentes tipos de diluyentes de larga duración (MR-A® y XT-R®), así como el costo-beneficio entre ambos productos. Este estudio utilizó 5 sementales entrenados de diez a doce meses de edad de las razas Yorkshire, Pietrain e híbrido Yorkshire-Landrace. Cada semental se colectó una vez por semana durante cuatro semanas. Una vez colectada la fracción espermática se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas, se realizaron las diluciones con el respectivo diluyente; se prepararon las dosis seminales en envases de 80 ml de capacidad, con una concentración 4,000 millones de espermatozoides y se estabilizaron durante una hora a temperatura ambiente (20-22 °C), posteriormente se almacenaron a una temperatura de 17 °C. Las variables analizadas fueron motilidad, anormalidades, pH y daño acrosomal a los 1, 3, 5 y 7 días de almacenamiento. El diluyente XT-R® produjo un menor porcentaje de anormalidades, encontrándose diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), a través de la prueba de Tukey. Se concluye que el diluyente de larga duración XT-R® al ser un producto de reciente introducción en el mercado es de uso confiable al ser comparado con un producto usado por más de dos décadas en la industria porcina.

INTRODUCCIÓN

La industria porcina atraviesa por cambios importantes debido a los adelantos obtenidos a través de las técnicas de reproducción asistida; entre los que se encuentra principalmente la inseminación artificial (IA). Sin embargo los avances generados por esta técnica deben ser evaluados cuidadosamente antes de ser incorporados a los sistemas de producción comercial y mejorar así los parámetros reproductivos de las explotaciones para obtener rendimientos cada vez mayores en cuanto a producción, mejoramiento genético y control sanitario (1). Hoy en día se estima que de los 72 a 76 millones de cerdas presentes en el mundo más del 25% quedan gestantes por IA. Según las últimas estimaciones mundiales (2001) más de 19 millones de inseminaciones se llevan a cabo, de las cuales el 99% se realiza con semen diluido conservado a una temperatura de 15 a 18 °C. De estas inseminaciones más del 85% se realizan en el mismo día de obtención de semen o al día siguiente (2, 3). Por otra parte, una aplicación incorrecta de la IA conllevará a una disminución de los parámetros reproductivos, siendo las faltas más frecuentes las siguientes: 1) calidad del material utilizado, 2) evaluación incorrecta de la calidad seminal, 3) fallas en la detección de estro, 4) mal uso de las técnicas IA, 5) condiciones higiénicas deficientes e 6) inadecuada selección del diluyente (1, 4).

La utilización de semen comercial ha aumentado el uso de la IA. Para asegurar una obtención de dosis seminales de alta calidad y tener éxito en los programas de IA, la evaluación de la calidad del eyaculado es el primer paso en el procesamiento del semen fresco (5,6). Idealmente el análisis del semen debe predecir de forma sencilla y eficaz la viabilidad de un eyaculado. Actualmente los estudios sobre evaluación seminal persiguen como objetivo final identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que

indique el estado de la célula espermática en un momento dado y que además se pueda correlacionar con la fertilidad y calidad del eyaculado. Sin olvidar que las técnicas de evaluación del semen, tanto para la utilización en la investigación como en la práctica, deben ser precisas, sencillas, rápidas y económicas. Hasta ahora las pruebas que se realizan en los centros de inseminación artificial (CIA) para detectar problemas de baja fertilidad e infertilidad cumplen dichas premisas.

Dos principios básicos son importantes para la evaluación de un eyaculado: 1) el uso de técnicas higiénicas y 2) el control de la temperatura (7). Ahora bien, también es cierto que dichas pruebas no son totalmente indicativas de la calidad seminal o fertilidad del animal. No obstante, la evaluación de semen tiene gran importancia en el diagnóstico de la capacidad fecundante de los espermatozoides de un eyaculado (8), ya que de los resultados obtenidos se podrá calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en la I.A. (8). Actualmente el análisis clásico se ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de investigación. Así el estudio de la motilidad espermática y las anomalías morfológicas, que anteriormente se hacían de una manera subjetiva, pueden realizar hoy en día mediante el uso de métodos computarizados de análisis (9). Algunas de las pruebas realizadas se describen a continuación:

Características macroscópicas

a) Color.- El color normal de un eyaculado es blanco variando la consistencia y tonalidad de acuoso transparente a cremoso amarillento, según la concentración espermática que contenga. Se pueden observar coloraciones atípicas violáceas, rosáceas o de color beige, que pueden ser debidas a posibles infecciones o hemorragias internas en tracto reproductor del macho.

b) Olor.- El semen debe ser inodoro, cualquier olor representa alguna alteración, la emisión puede ser debida a la presencia de fluidos prepucciales acumulados, como la orina que generalmente presenta una gran carga de bacterias y contaminantes (6, 10).

c) Volumen.- Varía según la edad, tamaño de los testículos, raza y estado fisiológico de cada verraco pero puede oscilar entre 80 a 500 ml de volumen total.

El eyaculado del verraco se compone de las siguientes fracciones:

Pre-espermática, es pobre en espermatozoides, transparente, líquida y su volumen oscila entre 10 y 15 ml aproximadamente.

Espermática, es rica en espermatozoides, de color blanco y muy densa, su volumen tiene un rango de 50 a 125 ml.

Post-espermática, es pobre en espermatozoides, de color blanquecino transparente y con grumos gelatinosos a lo largo de su emisión, el volumen aproximado es de 200 ml.

d) pH.- Los valores varían de 7.2 a 7.8, este sirve como un indicador de la actividad metabólica, ya que al envejecer el eyaculado aumenta la concentración de ácido láctico provocando un descenso del pH.

e) Temperatura.- Es importante registrar y mantener la temperatura del semen para evitar variaciones, ya que el semen porcino es particularmente sensible a los cambios térmicos (5). Para su dilución el semen se debe mantener a una temperatura de 34 a 36 °C (10).

Características microscópicas

Las características microscópicas que deben presentar los espermatozoides de un eyaculado viable son:

a) Motilidad progresiva.- Es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal para el que existen varias técnicas de estudio, pero la más utilizada y por ser más simple es la valoración subjetiva al microscopio de luz del porcentaje de espermatozoides

móviles y calidad de su movimiento (8). Para su evaluación el movimiento de los espermatozoides se ha dividido en dos tipos:

1) Movimiento de rotación y 2) Movimiento progresivo (desplazamiento de la célula) el cual puede ser lineal o circular. Además de la motilidad, al movimiento se le asigna un valor numérico que se expresa de la siguiente forma (Cuadro1).

Cuadro 1. Clasificación de motilidad espermática individual.

Valor	Característica
0	Sin movimiento.
1	Sin movimiento progresivo girando sobre si mismo.
2	Con movimientos anormales y algunos progresivos.
3	Movimientos progresivos lentos y sinuosos.
4	Movimiento progresivo rápido.
5	Movimiento progresivo muy rápido.

Tomado de La Piara Reproductora, 1ª. Edic. México, Mundi-Prensa 2002.

Es importante que las muestras analizadas no presenten una motilidad menor del 70 %, ya que el nivel de viabilidad se verá afectado (1, 4, 6, 8, 10, 11).

b) Concentración espermática: El rango oscila entre 50 a 700 millones de espermatozoides por ml. Existe una variabilidad muy grande entre la concentración de un eyaculado a otro, por ello es importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar. La concentración puede calcularse por varios métodos. Entre estos métodos destacan la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámaras de recuento celular como la de Thoma Bürker y de Neubauer (12,13). El método más extendido es el recuento celular, utilizando las cámaras mencionadas. Por otra parte la concentración espermática también depende de varios factores como son la raza, edad, condición corporal, estado sanitario, manejo, entre otros.

c) Formas anormales.- el semen de verraco debe tener menos del 20 a 30 % de células espermáticas anormales, ya que un aumento en estas trae como consecuencia una

disminución de la fertilidad. Generalmente las anomalías espermáticas se clasifican en tres grupos: 1) Cabeza, 2) Pieza Media, 3) Cola (4, 6, 11, 14, 15, 16,17).

Las malformaciones espermáticas de acuerdo a su origen se dividen en dos grupos:

1) Primarias.- Se originan a nivel de testículo durante el proceso de la espermatogénesis y de espermiogénesis.

2) Secundarias.- se presentan durante el proceso de maduración a nivel del epidídimo y por un inadecuado manejo durante el procesamiento del semen (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Clasificación de anomalías espermáticas.

Anormalidades Primarias	Anormalidades Secundarias
- Cresta nuclear	- Acrosoma vacuolado
- Defecto en la protuberancia acrosómica	- Aglutinación de flagelo con flagelo
- Defecto en el tamaño de la cabeza	- Múltiples cabezas
Macrocéfalo	- Flagelo enroscado
Microcéfalo	Segmento intermedio
- Defecto en la forma de la cabeza	Segmento principal
Ovalada	Segmento terminal
Elongada	- Gotas citoplasmáticas, proximal y distal
Elíptica	
Piriforme	
Triangular	
Cuadrangular	
Achatada	
Alargada	
- Flagelo abaxial	
- Flagelo corto	
- Flagelo largo	
- Flagelo grueso	
- Flagelo delgado	
- Múltiples flagelos	

Tomado de La Piara Reproductora, 1ª. Edic. México, Mundi-Prensa 2002.

La evaluación morfológica se realiza por medio de un frotis espermático teñido, existiendo para lograr este objetivo diferentes tinciones, como el Azul de Tripán y la Eosina-Nigrosina (4, 6, 10, 11).

d) Conteo de células vivas y muertas.- Para realizar la valoración de estos parámetros se pueden utilizar medios de coloración como el Azul de Tripán donde el espermatozoide vivo se observa blanco y el muerto azul, en el caso de la tinción Eosina-Nigrosina el vivo se observa blanco y el muerto rojizo (10).

e) Estado del acrosoma.- El acrosoma juega un papel importante durante el proceso de fertilización y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo (8). Las muestras con acrosomas ausentes o dañados suelen tener una baja fertilidad, ya que no contienen las enzimas necesarias para la penetración del óvulo. Para determinar el estado del acrosoma se han utilizado diferentes tinciones. Entre estas tenemos la tinción de Giemsa, la Eosina-Nigrosina, la Azul Tripán-Giemsa. Otra alternativa es la utilización de solución citrato formol o de una solución de glutaraldehído para la fijación de espermatozoides, la ventaja de este último método es el que no se requiere de una tinción (6, 8, 10).

f) Resistencia osmótica.- Esta prueba permite realizar una valoración de la viabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide. Se fundamenta en el sometimiento de los espermatozoides a un medio hipoosmótico, de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones. La evaluación del estado de los acrosomas permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados, así como predecir el comportamiento de los mismos tanto en lo referente a la fertilidad como a la capacidad de conservación (8, 10). El espermatozoide porcino presenta una presión osmótica de 290-300mOsm y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio (240-380 mOsm). Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250-290 mOsm, mientras que reduciéndose por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad.

En la actualidad se trabaja en la búsqueda de fórmulas más eficientes tanto biológicas como económicas que garanticen mayor tiempo de conservación de las células espermáticas y obtener mejores resultados después de fertilizar a las hembras (18). La

conservación del semen durante periodos prolongados de tiempo requiere que los espermatozoides reduzcan su actividad metabólica, mediante la reducción de la temperatura y su dilución en un medio adecuado; por lo que se utiliza un diluyente. El diluyente es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo un nivel de fertilidad adecuado. Para esto debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática, brindar protección frente al choque térmico por frío, controlar el pH, la presión osmótica e inhibir el crecimiento bacteriano del medio (19).

Los componentes del diluyente y las funciones de cada uno de estos son:

a) Fuente de energía.- Aporta glucosa para el mantenimiento metabólico de la célula espermática, aunque existen otras fuentes de energía como la galactosa, fructosa, ribosa y trehalosa.

b) Estabilizadores de membrana.- Albuminaséica bovina (BSA), Etilen disódico diamino tetraacetato (EDTA), Hidroxitolueno butilado (BHT), Polivinil pirrolidona (PVP-40), Alcohol polivinílico y Cisteína, que previenen o retardan las alteraciones no deseadas en la estructura y función de la membrana plasmática del espermatozoide (10, 19).

c) Amortiguadores de pH.- El pH de los diluyentes normalmente utilizados oscila entre 6.8 y 7.2. Entre los agentes tamponadores empleados se encuentran: el bicarbonato de sodio, citrato de sodio, el Tris, el ácido 3N-morfolino propanesulfónico (MOPS) y el ácido N-2-hidroxietilpiperazin N-2-etanosulfónico (HEPES). De la dilución inicial, se requieren de 60 a 90 minutos para la estabilización de sus componentes (4).

d) Electrolitos.- El cloruro de sodio (NaCl) y el cloruro de potasio (KCl), regulan la presión osmótica; que debe ser isotónica (300mOsm) o ligeramente hipertónica o hipotónica.

e) Antibióticos.- Los antimicrobianos más utilizados actualmente son: la Gentamicina, Lincomicina, Neomicina, Espectinomicina, Estreptomicina, Amoxicilina, y Penicilina, que inhiben el desarrollo microbiano (20).

Actualmente bajo las condiciones de producción, los diluyentes se han clasificado en tres grupos dependiendo de la duración de la viabilidad espermática así como el propósito de su uso:

Corta: Tiene como objetivo la conservación de los espermatozoides de 1 a 3 días. Se utiliza principalmente en empresas de distribución de dosis seminales a corta distancia o de autoconsumo. Los productos comerciales son: Beltsville liquid (BL-1), Beltsville Thawing Solution (BTS), Illinois Variable Temperature (IVT) y Kiev.

Mediana: Mantiene vivos a los espermatozoides de 4 a 5 días. Se utiliza principalmente en centros de inseminación artificial CIA. Únicamente se cuenta con V.S.P. Formula.

Larga: Mantiene viables a los espermatozoides viables por más de 5 días. Son propios de granjas donde la distancia entre lugar de producción seminal y el lugar donde será utilizado es lejana; además de permitir la realización de pruebas diagnósticas sobre el semen antes de ser utilizado, como la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para detectar la presencia de diversos virus o de realizar análisis completos de la calidad seminal, mejoran la organización de las tareas en los CIA y facilitan en gran medida la distribución de las dosis. En esta clasificación encontramos: Acromax®, Androhep®, Modena, MULBERRY III ®, Reading, SCK-7, Vital Formula®, X-Cell®, Zorlesco, ZORPVA, y el MR-A®, este último fue desarrollado en el año de 1984 y de los elementos que lo componen se pueden mencionar siguientes: glucosa, citrato sódico, EDTA, bicarbonato sódico, TRIS, cisteína, acetato potásico y MOPS. En investigaciones realizadas por Rillo et al. (1984); Pérez et al (1984); Martínez et al. (1986); Lyczynsky et

al. (1996) Conejo et al. (1998), obtuvieron resultados satisfactorios utilizando el diluyente MR-A®; demostrando que la viabilidad espermática puede ser mantenida en semen conservado en temperaturas de 15 a 17 °C por un periodo de tiempo de 5 a 9 días. Por otra parte, el diluyente XT-R® al tratarse de un producto de reciente introducción en el mercado mantiene protegida su composición cualitativa y cuantitativa. La principal desventaja que presentan estos productos es su elevado costo (10,19).

Como se mencionó anteriormente mantener la viabilidad espermática durante un tiempo determinado es el objetivo de cualquier diluyente, por lo que para cumplirlo es necesario utilizarlo de manera adecuada y tener presentes los siguientes factores:

Concentración espermática por dosis: la concentración espermática por dosis es variable, esto depende de las características productivas y reproductivas existentes en cada explotación o CIA. La concentración por dosis a utilizar puede ser de 2×10^9 a 6×10^9 de espermatozoides utilizando la técnica de IA convencional y 0.5×10^8 a 1×10^9 de espermatozoides en el caso de la técnica postcervical (1, 2, 10, 11, 21).

Agua: utilizar agua de buena calidad para diluir semen fresco es muy importante, ya que la viabilidad de los espermatozoides es superior que al emplear agua de menor calidad. El agua se clasifica en tres categorías:

- I. Agua sometida a procesos de destilación, deionización por ósmosis inversa y filtrado.
- II. Se obtiene por doble destilación en cristal.
- III. Es de destilación simple o deionizada por ósmosis inversa sin destilación.

El agua ideal para el diluyente es el agua bidestilada en vidrio o aquella que es purificada por ósmosis inversa, desmineralización, filtrado con carbono y rayos ultravioleta. La calidad del agua se reduce con el tiempo y puede ser afectada por la

contaminación, exposición a rayos ultravioleta, almacenamiento en contenedores de vidrio, metales pesados, sales inorgánicas y minerales (10, 20, 22).

Temperatura: para ser diluido el semen debe ser mantenido a una temperatura de 34 a 36° C, una vez que ha sido diluido la temperatura debe ser reducida en forma gradual para que alcance la temperatura ideal de conservación la cual es de 15 a 18 °C. Variaciones de 1 o 2 °C pueden afectar la calidad del semen, ya que es particularmente sensible a los cambios térmicos, debido a la composición de la membrana espermática (5, 6, 10, 21, 22).

Contaminación: todas las muestras de semen tienen algún nivel de contaminación, entre los principales contaminantes durante el procesamiento de semen se encuentran: bacterias, virus, células sanguíneas, células epiteliales, gotas citoplasmáticas, orina y la porción gelosa.

La contaminación produce una serie de alteraciones entre las que se encuentra una disminución de la motilidad, aglutinaciones espermáticas, aumento en el porcentaje de acrosomas alterados y una reducción del pH, todo ello conduce a una reducción en el tiempo de conservación de las dosis seminales, infertilidad y pueden posteriormente ser causa de infecciones uterinas (4, 10,19, 22,).

Almacenamiento: para almacenar las dosis seminales se debe descender la temperatura gradualmente durante dos a tres horas, posteriormente se almacenan en la estufa de conservación y se mantienen en un estado de anaerobiosis; para este objetivo se recomienda no dejar un volumen de aire superior al 20% en el envase para dosis seminal. El rango de temperatura para el almacenamiento y la conservación óptima de las estructuras espermáticas, y por ende de la viabilidad, es de 15 a 18 °C. Variaciones de temperatura de 1 o 2 ° C pueden afectar la calidad del semen.

El descenso de la temperatura induce una disminución del metabolismo, la motilidad espermática y el crecimiento bacteriano. Las temperaturas menores a 14 °C

causan alteraciones en las membranas espermáticas mientras que las temperaturas mayores a 20 °C no disminuyen el metabolismo celular espermático ni detiene el crecimiento bacteriano, disminuyendo así la vida útil del semen. Las dosis no deben estar expuestas a la luz directa durante periodos prolongados y deben ser rotadas suavemente cada 12 horas para mantener en suspensión a los espermatozoides y tener dosis correctamente mezcladas con el diluyente. Es importante seleccionar adecuadamente el tipo de diluyente a emplear, ya que este prolongará la viabilidad espermática durante el tiempo de almacenamiento (5, 10,19, 21).

Transporte: uno de los principales problemas en el transporte de semen es la conservación de una temperatura estable. Para disminuir variaciones en la temperatura se recomienda empaquetar el semen en cajas de material aislante térmico como el poliuretano. También se recomienda un doble empaque, para de esta forma asegurar la adecuada conservación del semen. El monitoreo de variaciones en la temperatura durante el transporte es de vital importancia, para esto se puede utilizar un termómetro de máximas y mínimas (5,10).

HIPÓTESIS

El uso del diluyente de larga duración XT-R® no mantiene las características espermáticas indicadas por el proveedor y tampoco reduce los costos en comparación con el MR-A®.

OBJETIVO

- 1.- Comparar las características espermáticas de motilidad, pH, anomalías (colas en látigo, en L o en ovillos) y daño acrosomal en el semen diluido de verraco, empleando dos diferentes tipos de diluyentes de larga duración (XT-R® y MR-A®).

2. – Comparar el costo-beneficio entre los dos tipos de diluyentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en una granja de ciclo completo que cuenta con su laboratorio de IA, ubicada en el Municipio de San Martín Texmelucan en el Estado de Puebla a una latitud de 19° 17' 00", longitud de 098°26'00" y a una altitud de 2360 metros sobre el nivel del mar.

Animales

Se utilizaron cinco sementales entrenados para IA, de 10 a 12 meses de edad, de las razas Yorkshire, Pietrain e híbrido Landrace–Yorkshire. Cada semental fue trabajado una vez por semana durante cuatro semanas.

Colecta de semen:

La obtención del semen se realizó por medio de la técnica de mano enguantada, para esto se utilizaron dos pares de guantes de polietileno desechables. Uno de estos se uso para realizar la limpieza del divertículo prepucial con el objeto de eliminar restos de orina presentes así como el recorte de pelos prepuciales para evitar contaminación de la muestra. El otro guante se utilizó para llevar a cabo la colecta de la fracción espermática y post-espermática. Estas fracciones, se depositaron en un termo colector atemperado a 37 °C, al cual se le colocaron dos filtros para evitar el paso de la porción gelosa y de los contaminantes.

Evaluación del semen:

El termo con el eyaculado se colocó en una caja de poliuretano y se llevó al laboratorio para su posterior análisis. Cada eyaculado fue identificado y durante todo el proceso de evaluación se colocó en Baño María a una temperatura constante de 35 °C. una vez en el laboratorio se procedió a analizar las características macroscópicas, las cuales fueron:

Color.- La tonalidad y consistencia del eyaculado fueron observados.

Olor.- El semen debe ser inodoro, cualquier olor representa una alteración.

Volumen.- Esta característica se midió con una balanza, haciendo la conversión de un gramo equivalente a un mililitro (ml).

pH.- Se utilizaron tiras reactivas y fue confirmado con un potenciómetro.

Temperatura.- Se tomó la temperatura con un termómetro de -10 a 120 °C en tres momentos, al llegar al laboratorio, antes y después de diluir el semen. Se controló la variación de 2 °C durante el proceso.

Las características microscópicas analizadas fueron:

Motilidad.- Al momento de evaluar el movimiento general de los espermatozoides (en masa), se colocó una gota de semen fresco sobre un portaobjetos, sobre ella un cubreobjetos (ambos atemperados a 35 °C) y se observó a través del objetivo de 10x de un microscopio óptico. La motilidad en masa aceptable para un eyaculado fue mínimo de 70%. Posteriormente se cambió el objetivo a 40x, para determinar el movimiento individual y se calificó de la siguiente manera (Cuadro 3):

Cuadro 3. Clasificación de motilidad espermática individual.

Valor	Característica
0	Sin movimiento.
1	Sin movimiento progresivo girando sobre si mismo.
2	Con movimientos anormales y algunos progresivos.
3	Movimientos progresivos lentos y sinuosos.
4	Movimiento progresivo rápido.
5	Movimiento progresivo muy rápido.

Tomado de La Piara Reproductora, 1ª. Edic. México, Mundi-Prensa 2002.

El valor aceptable fue a partir de 3. Cabe señalar que al evaluar esta característica también se evaluó la aglutinación, la cual se le asigna un valor de 0 a 3, en donde en esta

última indica la existencia de un 30 a 40% de espermatozoides aglutinados. El valor aceptable fue hasta 2.

Concentración.- Esta característica se evaluó empleando la cámara de Burker. El semen fue diluido 1:100 en una solución de citrato formolado, de esta dilución, se tomó una muestra con una pipeta Pasteur y se depositó en el retículo de la cámara. El conteo se realizó en un microscopio óptico con el objetivo de 40x, solamente se contaron los espermatozoides que se encontraban dentro de 40 cuadros. Con esta información se consultó una tabla comercial que indica el número de dosis seminales a elaborar.

Anormalidades.- La evaluación de la morfología se realizó por medio de un frotis teñido con Eosina-Nigrosina. El procedimiento consistió en tomar una muestra de semen fresco con una pipeta Pasteur y se colocó sobre un extremo de un portaobjetos limpio, seco y atemperado a 35 °C. Después se depositó una gota del colorante junto a la gota del semen, se homogenizó con otra pipeta Pasteur, se colocó otro portaobjetos en el extremo y se deslizó, se dejó secar el frotis por un minuto a temperatura ambiente y se observaron 100 espermatozoides en el microscopio óptico con el objetivo 40x. Finalmente se obtuvo el porcentaje (%) de células anormales. El porcentaje máximo de anomalías permitido fue de 20%.

Daño acrosomal.- Antes de determinar la integridad acrosomal, se preparó una solución de glutaraldehído que contiene 2.9 g de glucosa, 1.0 g de citrato sódico, 0.2 g de bicarbonato sódico, 8 ml de glutaraldehído al 25%. Una vez preparada la solución se depositó un ml de ésta en un vial y se añadió 0.05 ml de semen, se homogenizó, se tomaron 20 µl y se colocaron en un portaobjetos y encima de esta gota se depositó un cubreobjetos. Esta muestra se dejó reposar durante un minuto y finalmente se observó en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 40x. En esta muestra se evaluaron

100 células y se obtuvo el porcentaje de daño acrosomal. El valor máximo permitido fue de 20 % (4, 6, 9, 14).

Elaboración de dosis seminales: En el estudio se utilizaron dos diferentes tipos de diluyentes de larga duración MR-A® (Figura 1) y XT-R® (Figura 2), los cuales fueron diluidos con agua tridestilada a 37 °C una hora antes de su utilización, para permitir la activación de su capacidad amortiguadora y la homogenización de sus componentes, por lo que se utilizó una termoplatina y una bala magnética.



Figura 1. Diluyente MR-A® presentación en polvo para 1 L de agua tridestilada.



Figura 2. Diluyente XT-R®, presentación en polvo para 1 L de agua tridestilada.

La mezcla semen-diluyente, se llevo a cabo teniendo la precaución de que no existiera una diferencia de temperatura mayor a 1 °C entre éstos.

Una vez hecha la homogenización se volvió a evaluar la motilidad, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Después de este paso, se procedió a envasar el semen diluido en bolsas, cuya capacidad fue de 80 ml; cada dosis tenía una concentración de 4,000 millones de espermatozoides. Dichas dosis se mantuvieron a temperatura ambiente (20-22 °C), durante una hora y posteriormente fueron almacenadas a 17 °C en una estufa de conservación.

Evaluación de las dosis seminales: Las dosis seminales fueron trasladadas en una caja de poliuretano (termo) al Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad

de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para su evaluación.

Un total de 40 muestras fueron analizadas durante todo el periodo de evaluación, 20 con diluyente MR-A® y 20 con diluyente XT-R®. Las características evaluadas fueron: motilidad, anormalidades y daño acrosomal durante 1, 3, 5 y 7 días de almacenamiento. Durante el tiempo de prueba, las dosis se mantuvieron a 17 °C.

Análisis estadístico: Para las variables motilidad, anormalidades y daño acrosomal, se utilizó la prueba de Tukey del paquete estadístico SAS.

RESULTADOS

Características macroscópicas:

Color.- Todos los eyaculados evaluados presentaron un color blanco lechoso durante todo el transcurso de la prueba.

Olor.- Los 20 eyaculados obtenidos no presentaron olor que indicara alguna anomalía.

Volumen.- En el cuadro 4 se puede observar que en promedio el volumen de los eyaculados fue 201.49 ml, siendo los valores mayores para los sementales 1 y 2; 236 ml y 258.75 ml, respectivamente, y los valores menores para los sementales 3,4 y 5; 158.75 ml, 167.5 ml y 186.25 ml.

Cuadro 4. Volumen de los eyaculados obtenidos por semental.

Número de semental	Raza	Volumen promedio (ml)
1	Yorkshire	236.2
2	York-Landrace	258.75
3	Landrace	158.75
4	York-Landrace	167.5
5	York-Landrace	186.25
Promedio		201.49

pH al momento de la colecta.- El pH en los 20 eyaculados fue neutro (pH 7.0).

Temperatura.- En el cuadro 5 se muestra la temperatura obtenida por semental al momento de la colecta donde los sementales 1 y 3 registraron los valores mayores 36.7°C y 36.5°C respectivamente, los sementales 2, 4, y 5 presentaron los mismos valores menores los cuales fueron de 36.2°C.

Cuadro 5. Temperatura de los eyaculados obtenidos por semental al momento de la colecta.

Número de semental	Raza	Temperatura promedio (°C)
1	Yorkshire	36.7
2	York-Landrace	36.2
3	Landrace	36.5
4	York-Landrace	36.2
5	York-Landrace	36.2
Promedio		36.36

Características microscópicas

Motilidad al momento de la colecta.- En el cuadro 6 se observa que la motilidad promedio fue de 89, siendo para los sementales 2 y 3 la motilidad mayor con valores de 90; para los sementales 1, 4 y 5 la motilidad fue menor, presentaron valores de 88.75, 88.75 y 87.5 respectivamente.

Cuadro 6. Porcentaje de motilidad espermática por semental al momento de la colecta (día cero).

Semental	Raza	Porcentaje de motilidad al día cero
1	Yorkshire	88.75
2	York-Landrace	90
3	Landrace	90
4	York-Landrace	88.75
5	York-Landrace	87.5
Promedio		89

La evaluación de los diluyentes MR-A® y XT-R® en forma general, se observó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) (cuadro 7). El porcentaje de anomalías morfológicas espermáticas (secundarias y primarias) fue de 12.8875 para el diluyente

MR-A® y 10.0375 para el XT-R® encontrándose diferencia estadística significativa con un error estándar de 0.7483; para la característica de motilidad se obtuvieron valores de 76.9375 para el MR-A® y 77.3125 para el XT-R® con un error estándar de 0.6584; para la característica de daño acrosomal los valores fueron de 6.5375 y 6.8125 para el MR-A® y XT-R® respectivamente, con un error estándar de 0.2259, en cuanto a los valores de pH para el MR-A® fue de 7.085 y 7.0675 para el XT-R® con un error estándar de 0.032, sin embargo no se encontró diferencia estadística significativa en las características de motilidad, daño acrosomal y pH.

Cuadro 7. Comparación de los diluyentes MR-A® y XT-R® sobre características evaluadas.

Característica	Diluyente		E.E.
	MR-A	XT-R	
Motilidad	76.9375	77.3125	0.6584
Daño acrosomal	6.5375	6.8125	0.2259
Anormalidades	12.8875 ^a	10.0375 ^b	0.7483
pH	7.0875	7.0675	0.032

E. E. = Error estándar

Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).



Figura 3. La imagen muestra en el extremo izquierdo un espermatozoide con flagelo en forma de ovillo.



Figura 4. Anormalidad espermática con flagelo en forma de L.



Figura 5. Espermatozoide que presenta flagelo en forma de látigo.

Al evaluar el porcentaje de anomalías morfológicas espermáticas secundarias entre ambos diluyentes de manera individual durante el periodo de almacenamiento, se observó que a partir del día 1 y hasta el día 7, los espermatozoides mantenidos en el diluyente MR-A® presentaron un mayor porcentaje de anomalías morfológicas (11.45 y 14.25 respectivamente) que los mantenidos en el diluyente XT-R® (8.86 y 11.35 respectivamente) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje promedio de anomalías morfológicas secundarias durante el periodo de almacenamiento de los espermatozoides en los diluyentes MR-A® y XT-R®.

Diluyentes	D1	D3	D5	D7	EE	P
MR-A	11.65 ^a	12.25 ^a	13.4 ^a	14.25 ^a	1.3226	0.2136
XT-R	8.86 ^a	9.6 ^a	10.35 ^{ab}	11.35 ^b	0.8581	0.0334

E.E.= Error estándar

Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

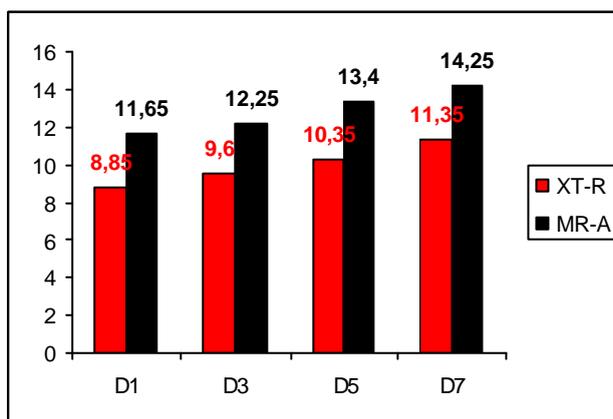
Aunque el diluyente XT-R® presentó un incremento en las anomalías morfológicas espermáticas secundarias durante el periodo de almacenamiento, este porcentaje siempre fue inferior al diluyente MR-A® (Cuadro 9, gráfica1).

Cuadro 9. Porcentaje de anomalías morfológicas espermáticas secundarias entre los diluyentes MR-A® y XT-R® a los días 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento.

Diluyente	D1	E.E.	D 3	E.E.	D 5	E.E.	D 7	E.E.
MR-A	11.65 ^a	0,7799	12.25 ^a	0,7845	13.4 ^a	0,8339	14.25 ^a	0,7577
XT-R	8.85 ^b	0,7799	9.6 ^b	0,7845	10.35 ^b	0,8339	11.35 ^b	0,7577
P	0,0166		0,02		0,0148		0,0111	

E.E.= Error estándar

Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)



Gráfica 1. Comparación del porcentaje de anomalías espermáticas entre los diluyentes MR-A® y XT-R® a los días 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento.

DISCUSIÓN

En este estudio los diluyentes MR-A® y XT-R® mantuvieron en óptimas condiciones el porcentaje de motilidad hasta el quinto día de almacenamiento (74.25 %). Resultados similares fueron reportados por **Pérez *et al.* 1984 (23)** en sementales de la raza Landrace, ya que obtuvieron un 70.3 % de motilidad espermática al noveno día de almacenamiento, utilizando el diluyente de larga duración MR-A®. Así mismo **Rillo *et al.* 1984 (24)**, utilizando el mismo diluyente en cerdos y almacenando las dosis a una temperatura de 15 °C por un periodo de siete días, no encontraron efectos desfavorables para esta característica. El porcentaje de daño acrosomal (8.32 %) y pH (6.92 %) encontrados al séptimo día de almacenamiento en este trabajo no superaron las cantidades permitidas que se señalan como límite para desechar una muestra seminal y que concuerdan con lo reportado por **Rodríguez *et al.* 1994 (25)**, con el diluyente MR-A® por un periodo de cinco días.

Se sabe que el flagelo es importante en la motilidad espermática, por lo que cualquier anomalía en su estructura o en alguno de sus componentes es de grave consecuencia en la capacidad fertilizante de la célula. La gama de anomalías flagelares pueden que ser detectadas al microscopio óptico de luz, van desde las colas dobladas, colas en "L" o en ovillo; estas anomalías pueden afectar componentes subcelulares como mitocondrias, fibras densas externas o vaina fibrosa, que no pueden ser detectadas por los métodos convencionales de análisis del semen. Así, estas condiciones anómalas en el flagelo pueden resultar en la incapacidad para que el espermatozoide logre ascender al tacto reproductivo de la hembra y alcanzar el sitio de fertilización. **Zamboni 1987(26)**. En este estadio el porcentaje de anomalías en el flagelo fue de (12.8875) y (10.0375) para

los diluyentes MR-A® y XT-R® respectivamente, aunque no superó el nivel máximo permitido para eliminar una muestra, si fue superior para el diluyente MR-A®, resultado semejante a lo reportado por **Liczynski et al. 1996 (27)**, que al evaluar muestras seminales diluidas con el diluyente MR-A® provenientes de 6 sementales híbridos colectados con la técnica manual y almacenadas durante un periodo de almacenamiento de 8 días a una temperatura de 15 °C, el porcentaje de anormalidades no rebasó el límite máximo permitido para eliminar una muestra.

Sin embargo otros factores que pueden incrementar las anormalidades espermáticas (colas en látigo, en L o en ovillos) ajenas al diluyente deben ser considerados, como: choque térmico, choque osmótico, cambios bruscos de pH, sustancias espermicidas, machos estresados y rayos UV.

Diversos estudios indican que los productos metabólicos como las endotoxinas de algunas bacterias tienen efectos detrimentales para la sobrevivencia del espermatozoide por lo que la viabilidad y la cantidad de células espermáticas se ven reducidas **Almond G. et al 2001 (28)**. El comportamiento del diluyente XT-R® para la variable de porcentaje de anormalidades morfológicas espermáticas secundarias fue menor durante el periodo de almacenamiento lo cual probablemente se deba a que contiene una nueva mezcla de cuatro antibióticos que trabajan de forma eficiente a 17 °C, inhibiendo el desarrollo microbiano, así como antioxidantes que previenen o retardan las alteraciones no deseadas en la estructura y funciones de las membranas plasmáticas de los espermatozoides manteniendo así su integridad, lo que resulta fundamental para el metabolismo espermático, capacitación y la reacción acrosómica.

La integridad del acrosoma es esencial considerando que éste contiene enzimas que tienen un papel de vital importancia en la penetración de la zona pelúcida del óvulo **Kjoestad et al., 1993 (29); Kumer et al 2003 (30)**. El porcentaje de daño acrosomal en este estudio fue de (6.5375) y (6.8125) para los diluyentes MR-A® y XT-R® respectivamente; aunque el porcentaje de daño acrosomal fue ligeramente mayor en el diluyente XT-R® durante el periodo de almacenamiento no se encontró diferencia estadística significativa coincidiendo con lo reportado por **Kommisrud E. et al 2002 (31)**., que al evaluar el daño acrosomal de muestras seminales mantenidas en refrigeración durante un periodo de cinco días, empleando diluyentes de larga duración provenientes de sementales de las razas Duroc, Landrace, híbridos Duroc-Landrace y Yorkshire, no encontró diferencia estadística significativa.

Durante este estudio los porcentajes de daño acrosomal no rebasaron los niveles máximos permitidos para eliminar una muestra, lo cual se deba probablemente a una nueva mezcla de antioxidantes que permiten mantener la integridad espermática y el correcto funcionamiento metabólico.

CONCLUSIONES

1. El diluyente de larga duración XT-R® mantiene dentro de los rangos normales las características seminales como son motilidad, pH, anormalidades y daño acrosomal durante un periodo de 5 días de almacenamiento a una temperatura de 17 °C, además este producto representa para el porcicultor un ahorro del 10 a 13 % por concepto de este rubro.

LITERATURA CITADA

- 1.- Page GT. Artificial insemination in swine. Louisiana State University. USA.1998.

- 2.- Hernández LES. Comparación de dos técnicas de inseminación artificial: postcervical y convencional en una granja porcina en el Estado de México (tesis licenciatura). México D.F. (México D.F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.

- 3.- Decuadro-Hansen G. Animal and human reproduction, artificial inseminación. Control sanitario de los verracos. (2003) (6 pantallas). Available from: <http://www.IMVTechnologies.com>

- 4.- Levis GD. On farm evaluation of semen: motility, morphology and contamination. The Ohio State University Extensión. USA. 2004.

- 5.- Conservación de la calidad del semen. Diluentes, empaque, temperatura y transporte. (2001). Available from: http://www.naab-css.org/about_css/disease_control-2002-SP.htm

- 6.- Kevin JR. Evaluating boar semen quality. North Carolina State University. USA. 2002.

- 7.- Wayne LS. A guide basic to boar semen collection and processing procedures. Purdue University. USA. 2003.

- 8.- Quintero MAA. Estudio sobre la dinámica de poblaciones en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 2003.

- 9.-** Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Blanco O, Lucas X, Matas C. 1997. Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. IV Simposium Internacional de Reproducción e IA porcina. Madrid, 83-90.
- 10.-** Espinosa HS. Inseminación Artificial Editores Trujillo OM, Martínez GR, Herradora LMA. La Piara Reproductora. 1ª ed. México: Mundi-Prensa, 2002: 165-186.
- 11.-** PIC. Artificial insemination. semen processing and quality control (2003). Available from: http://www.pic.com/usa/resources/files/AI_1_2.pdf
- 12.-** Hafez ESE; Hafez B. Reproduction in Farm Animals. 7th edition, Baltimore/USA. 2000: 509.
- 13.-** Woelders H. 1990. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod Dom Ani; Sppl* (1): 145-164.
- 14.-** Pat S. Why evaluate semen. (2003) Available from: http://epicentre.massey.ac.nz/Downloads/Documents/PigHealth/PVSN_2003_2.pdf
- 15.-** Serrano G, Fuentes, Sosa G S, Valle A, Regueiro C. Estudio de las anomalías espermáticas del verraco, en relación con raza, tipo y clima en Venezuela. (1995) Available from: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/zt1401/texto/anormalidades.htm>

- 16.-** Córdoba IA, Pérez GJF, Martín RS, García AC, Lleo CB, Saltijeral OJ, Hernández PE, Fernández RF. La valoración seminal y la fertilidad de los verracos. (2000) Available from: <http://www.revista-anaporc.com/contenidos/severra.htm>
- 17.-** Serrano GL, Fuentes A, Valle A, Regueiro C. Estudio de las anomalías espermiáticas de los verracos en relación con raza y época. (1988) Available from: <http://www.ceniap.gov.ve/ztweb/zt0712/texto/estudio.htm>
- 18.-** Velázquez I, Del Toro Y, Mora G. Calidad espermática de semen porcino conservado en estado fresco con un nuevo diluyente conservador. (1995) Available from: <http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/rccpn/Rev41/IVON.htm>
- 19.-** Gadea MJ. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Spanish Journal of Agricultural Research 2003; 2:17-27.
- 20.-** AI Semen Diluents. Artificial Insemination-Health. (2004). (4pantallas) Available from: <http://www.vetmedia.iastate.edu>.
- 21.-** Processing Fresh Semen. Swine Genetics Internacional LTD. (2002). Available from: http://www.swinegenetics.com/ai_catalog/ai_processing.htm
- 22.-** Glen A, Pariwat P. Semen contamination and choosing antibiotics. Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. North Carolina State University. USA. 2002.

- 23.-** Pérez GL, Lozano C, Sánchez SR. Fertility results in swine using the sperma's diluents MR-A and Zorlesco in the storage period at 15°C. Proceedings of the 8th IPVS Congress, Gheat, Belgium, 27-31 August 1984.
- 24.-** Rillo M, Sebastián JJ, Alias E, Díaz YC. The effects of antibiotic associations in the conservation of boar semen at 15° C. Proceedings of the 8th IPVS Congress, Gheat, Belgium, 27-31 August 1984.
- 25.-** Rodríguez S, Saiz CF, Sánchez R, García P, Ruvalcaba JA, Rillo M. Whole fertility results with two preparation and application methods of boar semen doses. Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 June 1994.
- 26.-** Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertility and Sterility* 1987; 48: 711-734.
- 27.-** Lyczynski A, Kolat K, Rillo M. Fertility and Prolificacy in sows after insemination with boar semen preserved in MR-A diluent. Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, Italy 7-10 July 1996.
- 28.-** Almond G, Poolperm P. Semen contamination and chossing antibiotics. North Carolina State University. USA. 2001.

29.- Conejo NL, Ochoa VG, Becerril AJ, Ortega GR, Juárez MA. Fertilidad y prolificidad de semen porcino conservado en tres diluyentes de larga duración. V Simposium internacional de reproducción e inseminación artificial en porcinos. Guanajuato, México Mayo 4–6 de 1998.

ANEXOS

Volumen obtenido del eyaculado por semental por número de colecta.

Semental	Número de colecta	Volumen (ml)
1	1	300
1	2	225
1	3	200
1	4	220
2	1	275
2	2	225
2	3	235
2	4	300
3	1	150
3	2	225
3	3	110
3	4	150
4	1	125
4	2	220
4	3	175
4	4	150
5	1	200
5	2	170
5	3	175
5	4	200

2. Registro de temperatura por eyaculado por semental al momento de la colecta.

Semental	Número de colecta	Temperatura (°C)
1	1	36
1	2	36
1	3	37
1	4	38
2	1	37
2	2	36
2	3	36
2	4	36
3	1	36
3	2	36
3	3	37
3	4	37
4	1	36
4	2	36
4	3	37
4	4	36
5	1	36
5	2	37
5	3	36
5	4	36

3. Porcentaje de motilidad espermática en masa registrada por semental al momento de la colecta (día cero).

Semental	Número de colecta	Porcentaje de motilidad espermática
1	1	90
1	2	85
1	3	90
1	4	90
2	1	90
2	2	90
2	3	90
2	4	90
3	1	90
3	2	90
3	3	90
3	4	90
4	1	90
4	2	90
4	3	85
4	4	90
5	1	85
5	2	90
5	3	85
5	4	90

4. Registro de las variables evaluadas por semental y número de colecta de porcentaje de motilidad espermática en masa, daño acrosomal y anomalías espermáticas morfológicas secundarias, obtenidos en los días 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento mantenidos en el diluyente XT-R®.

Semental	Número de colecta	Diluyente	Día de almacenaje	Porcentaje de motilidad espermática en masa	Porcentaje de daño acrosomal	Porcentaje de anomalías espermáticas morfológicas secundarias
1	1	XTR	D1	90	6	6
1	2	XTR	D1	90	4	11
1	3	XTR	D1	85	6	11
1	4	XTR	D1	85	7	6
2	1	XTR	D1	90	5	7
2	2	XTR	D1	85	6	7
2	3	XTR	D1	90	3	11
2	4	XTR	D1	90	6	10
3	1	XTR	D1	80	4	5
3	2	XTR	D1	90	5	8
3	3	XTR	D1	90	3	9
3	4	XTR	D1	90	4	9
4	1	XTR	D1	90	3	9
4	2	XTR	D1	90	3	10
4	3	XTR	D1	90	7	5
4	4	XTR	D1	90	5	8
5	1	XTR	D1	90	4	7
5	2	XTR	D1	90	5	14
5	3	XTR	D1	90	5	12
5	4	XTR	D1	90	5	12
1	1	XTR	D3	85	8	6
1	2	XTR	D3	85	7	12
1	3	XTR	D3	75	7	12
1	4	XTR	D3	80	8	6
2	1	XTR	D3	85	6	8
2	2	XTR	D3	80	7	8
2	3	XTR	D3	80	5	11
2	4	XTR	D3	85	8	11
3	1	XTR	D3	75	4	5
3	2	XTR	D3	85	6	8
3	3	XTR	D3	85	7	9
3	4	XTR	D3	80	6	11
4	1	XTR	D3	80	3	9
4	2	XTR	D3	80	7	10
4	3	XTR	D3	85	9	7

4	4	XTR	D3	80	7	9
5	1	XTR	D3	80	4	8
5	2	XTR	D3	75	5	17
5	3	XTR	D3	80	7	12
5	4	XTR	D3	80	6	13
1	1	XTR	D5	70	9	6
1	2	XTR	D5	80	9	13
1	3	XTR	D5	70	7	14
1	4	XTR	D5	70	9	7
2	1	XTR	D5	80	7	9
2	2	XTR	D5	75	9	8
2	3	XTR	D5	75	6	13
2	4	XTR	D5	70	10	11
3	1	XTR	D5	70	6	6
3	2	XTR	D5	85	6	8
3	3	XTR	D5	80	7	10
3	4	XTR	D5	75	6	13
4	1	XTR	D5	75	5	9
4	2	XTR	D5	75	8	12
4	3	XTR	D5	75	10	7
4	4	XTR	D5	75	9	9
5	1	XTR	D5	70	7	8
5	2	XTR	D5	70	6	17
5	3	XTR	D5	70	7	14
5	4	XTR	D5	75	6	13
1	1	XTR	D7	70	11	8
1	2	XTR	D7	75	9	13
1	3	XTR	D7	60	9	14
1	4	XTR	D7	60	9	9
2	1	XTR	D7	70	9	9
2	2	XTR	D7	75	10	9
2	3	XTR	D7	70	9	14
2	4	XTR	D7	60	10	11
3	1	XTR	D7	60	6	7
3	2	XTR	D7	60	8	9
3	3	XTR	D7	65	8	11
3	4	XTR	D7	65	8	13
4	1	XTR	D7	65	5	10
4	2	XTR	D7	75	9	13
4	3	XTR	D7	60	12	9
4	4	XTR	D7	75	9	10
5	1	XTR	D7	65	7	11
5	2	XTR	D7	65	7	18
5	3	XTR	D7	50	10	15
5	4	XTR	D7	60	8	14

5. Registro de las variables evaluadas por semental y número de colecta de porcentaje de motilidad espermática en masa, daño acrosomal y anomalías espermáticas morfológicas secundarias, obtenidos en los días 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento mantenidos en el diluyente MR-A®.

Semental	Número de colecta	Diluyente	Día de almacenaje	Porcentaje de motilidad espermática en masa	Porcentaje de daño acrosomal	Porcentaje de anomalías espermáticas morfológicas secundarias
1	1	MRA	D1	90	5	7
1	2	MRA	D1	80	5	20
1	3	MRA	D1	90	5	7
1	4	MRA	D1	90	6	8
2	1	MRA	D1	85	4	15
2	2	MRA	D1	90	2	10
2	3	MRA	D1	90	4	12
2	4	MRA	D1	80	4	18
3	1	MRA	D1	90	5	12
3	2	MRA	D1	90	5	12
3	3	MRA	D1	90	5	9
3	4	MRA	D1	85	4	15
4	1	MRA	D1	90	6	11
4	2	MRA	D1	85	4	9
4	3	MRA	D1	85	5	7
4	4	MRA	D1	90	6	7
5	1	MRA	D1	80	3	20
5	2	MRA	D1	90	3	9
5	3	MRA	D1	80	6	16
5	4	MRA	D1	90	6	9
1	1	MRA	D3	80	7	8
1	2	MRA	D3	80	8	20
1	3	MRA	D3	80	7	7
1	4	MRA	D3	85	8	9
2	1	MRA	D3	85	6	16
2	2	MRA	D3	80	4	11
2	3	MRA	D3	85	6	12
2	4	MRA	D3	75	4	17
3	1	MRA	D3	85	5	12
3	2	MRA	D3	80	9	12
3	3	MRA	D3	85	7	12
3	4	MRA	D3	85	6	16
4	1	MRA	D3	85	7	12
4	2	MRA	D3	70	5	11
4	3	MRA	D3	80	7	8

4	4	MRA	D3	80	6	7
5	1	MRA	D3	80	5	20
5	2	MRA	D3	80	5	9
5	3	MRA	D3	80	9	17
5	4	MRA	D3	80	7	9
1	1	MRA	D5	75	7	9
1	2	MRA	D5	70	9	22
1	3	MRA	D5	75	8	8
1	4	MRA	D5	75	8	9
2	1	MRA	D5	80	6	16
2	2	MRA	D5	70	5	13
2	3	MRA	D5	75	7	14
2	4	MRA	D5	75	5	18
3	1	MRA	D5	75	6	14
3	2	MRA	D5	80	11	14
3	3	MRA	D5	70	7	13
3	4	MRA	D5	80	6	16
4	1	MRA	D5	80	9	13
4	2	MRA	D5	70	5	12
4	3	MRA	D5	75	7	9
4	4	MRA	D5	70	7	9
5	1	MRA	D5	70	7	22
5	2	MRA	D5	70	5	11
5	3	MRA	D5	75	9	17
5	4	MRA	D5	75	8	9
1	1	MRA	D7	65	7	10
1	2	MRA	D7	65	9	22
1	3	MRA	D7	60	8	9
1	4	MRA	D7	60	9	9
2	1	MRA	D7	70	9	16
2	2	MRA	D7	65	7	14
2	3	MRA	D7	65	8	16
2	4	MRA	D7	65	5	20
3	1	MRA	D7	65	8	16
3	2	MRA	D7	70	11	15
3	3	MRA	D7	65	7	13
3	4	MRA	D7	70	9	16
4	1	MRA	D7	75	9	13
4	2	MRA	D7	65	5	14
4	3	MRA	D7	65	7	10
4	4	MRA	D7	65	9	9
5	1	MRA	D7	65	7	22
5	2	MRA	D7	60	7	13
5	3	MRA	D7	70	11	18
5	4	MRA	D7	60	8	10
