

"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA



(Creada por Ley N° 25265)



FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ZOOTECNIA

TESIS

EFFECTO DE DOS DILUTORES SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN
DE SEMEN DE VERRACO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO ZOOTECNISTA

PRESENTADO POR:

Bach. BELLIDO HUAMAN, Edilberto

Bach. BLANCO YARINGAÑO, Helder Stewart

ASESOR:

Dr. JAIME ANTONIO RUIZ BEJAR

HUANCAVELICA - PERÚ

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCVELICA FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 27 días del mes de mayo del año 2013, a horas 3:00 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **Dr. Nicasio VALENCIA MAMANI (PRESIDENTE)**, **M.Sc. Héctor Marcelo GUILLEN DOMINGUEZ (SECRETARIO)**, **Ing. Marino ARTICA FELIX (VOCAL)**, **Mg. Blas REYMUNDO CÓNDOR (ACCESITARIO)**, designados con la Resolución de Consejo de Facultad N° 047-2012-FCI-COG-UNH, de fecha 13 de enero del 2012, ratificados con la Resolución de Decano N°150-2013-FCI-UNH de fecha 22 de mayo del 2013 y modificado el titulo del proyecto de investigación (Tesis) con la Resolución de Decano N° 126-2013-FCI-UNH de fecha 07 de mayo del 2013, a fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EFECTO DE DOS DILUTORES SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE VERRACO", presentado por los Bachilleres **Edilberto Bellido Huamán y Helder Stewart Blanco Yaringaño**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**; en presencia del **Dr. Jaime Antonio RUIZ BEJAR**, Asesor del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas...4:20 p.m.; se invitó al público presente y a los sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

Edilberto BELLIDO HUAMAN

APROBADO POR... Mayoría.....

DESAPROBADO

Helder Stewart BLANCO YARINGAÑO

APROBADO POR... Mayoría.....

DESAPROBADO

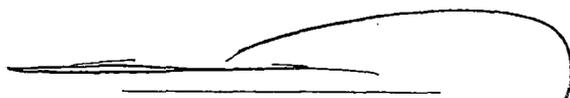
En conformidad a lo actuado firmamos a continuación:



Presidente



Secretario



Vocal



Vº Bº Decano

DEDICATORIA

A nuestros padres, por enseñarnos que la mejor herencia que nos pueden dar en esta vida es el estudio, por todos esos valiosos consejos y el apoyo que nos han brindado y sobre todo agradecidos por iniciarnos en una nueva etapa de la vida, que hoy en día nos lleva a lograr los objetivos. Les dedicamos esta tesis como muestra de agradecimiento y amor incondicional.

A nuestros hermanos, por el buen ejemplo y apoyo que siempre nos brindaron y mostrarnos el camino del bien y la verdad.

A nuestra alma mater por el gran regocijo que nos da poder de terminar esta carrera en donde profesores y compañeros dejan parte de su vida, solo sabemos que este camino es el comienzo de grandes logros y éxitos.

Helder y Edilberto

AGRADECIMIENTO

A nuestros Jurados por su generosidad al brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la finalización de este trabajo.

Al Dr. Jaime Antonio Ruiz Bejar asesor del proyecto de tesis, quien con sus valiosas recomendaciones y sugerencias ayudaron al buen desarrollo de esta tesis.

Al Sr. José Mendoza Mallma por habernos apoyado en el Laboratorio de Tecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, y guiarnos en el proceso de evaluación de las muestras del presente trabajo de investigación.

Queremos dejar constancia de nuestro sincero agradecimiento, a todos nuestros maestros que con sus conocimientos, experiencias y enseñanzas nos han motivado a seguir siempre adelante.

Al encargado del Centro Experimental de Porcinos de E.A.P Zootecnia de la Universidad Nacional de Huancavelica, por las facilidades prestadas en el presente trabajo de investigación.

A nuestros compañeros de la universidad, con quienes compartimos muchos momentos, de experiencias y conocimientos.

A nuestros padres por brindarnos su cariño, comprensión y apoyo incondicional, el ánimo de nuestros hermanos y gracias por sus comentarios, sugerencias y opiniones que han sido un gran apoyo para hacer de nosotros hombres en búsqueda constante de la verdad.

7+

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
ÍNDICE	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
CAPÍTULO I	
PROBLEMA	
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	10
1.3. OBJETIVO	10
1.3.1 Objetivo General	10
1.3.2 Objetivo Específicos	10
1.4. JUSTIFICACIÓN	10
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1 ANTECEDENTES	12
2.2 BASES TEÓRICAS	15
2.2.1 Manejo reproductivo del verraco	15
2.2.2 Evaluación del semen	24
2.2.3 Diluyente	31
2.2.4 Dilución del semen	36
2.2.5 Almacenamiento y conservación del semen	38
2.2.6 Congelación de Semen	39
2.2.7 Descongelación de semen	40
2.3 HIPÓTESIS	40
2.4 VARIABLES DE ESTUDIO	40
2.4.1 Variables independientes	40
2.4.2 Variables Dependientes	40

CAPITULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1	ÁMBITO DE ESTUDIO	41
3.2	TIPO DE INVESTIGACIÓN	41
3.3	NIVEL DE INVESTIGACIÓN	41
3.4	MÉTODO DE INVESTIGACIÓN	41
3.5	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	41
3.6	MUESTREO	42
3.7	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	42
3.8	PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	43
3.9	ANÁLISIS DE ESTADISTICO	50

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1	EVALUACION SEMINAL EN ESTADO FRESCO	51
4.2	EVALUACION SEMINAL POST CONGELAMIENTO	52
	4.2.1 MOTILIDAD MASAL	52
	4.2.2 ESPERMATOZOIDES VIVOS	54

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ANEXOS

75.

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Composición Química del Dilutor BTS (Beltsville Thawing Solution) empleado para la criopreservación del semen de verraco.	47
2. Composición Química del Dilutor Tris-Glucosa-Yema Huevo empleado para la criopreservación del semen de verraco.	48
EN RESULTADOS	
3. Valores promedios y desviación estándar de las variables en estado fresco.	51
4. Motilidad masal por tipo de diluyente en semen post congelamiento.	52
5. Espermatozoides vivos por tipo de diluyente en semen post congelamiento.	54
EN ANEXOS	
6. Datos de la variable motilidad espermática transformados de porcentaje a arco seno.	66
7. Análisis de varianza para la variable motilidad espermática	66
8. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz cuadrada del medio del error y media de la variable motilidad espermática.	67
9. Análisis de varianza para la variable motilidad espermática (tratamiento y bloque).	67
10. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable motilidad espermática en tratamientos	67
11. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable motilidad espermática en bloques.	67
12. Datos de la variable espermatozoides vivos transformados de porcentaje a arco seno	68
13. Análisis de varianza para la variable espermatozoides vivos.	68
14. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz cuadrada del medio del error y media de la variable espermatozoides vivos.	68
15. Análisis de varianza para la variable espermatozoides vivos (tratamiento y bloque)	69
16. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable espermatozoides vivos. en tratamientos.	69
17. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable espermatozoides vivos en bloques.	69
18. Datos de motilidad espermática y espermatozoides vivos en estado fresco transformado a Arco Seno	70
19. Datos de motilidad espermática post congelamiento transformados a Arco Seno.	70
20. Datos de espermatozoides vivos post congelamiento transformados a Arco Seno.	70

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco, para la realización del trabajo se utilizaron los eyaculados de dos verracos de raza mejorada, el semen de los verracos fue obtenido previo adiestramiento en un potro, la frecuencia de colección fue dos veces por semana en horas de la mañana. Las muestras obtenidas fueron llevadas al laboratorio para evaluar sus características microscópicas y determinar si era apto para su congelación y diluir en BTS y TRIS para la congelación. Dichas muestras se agruparon aleatoriamente en dos tratamientos (T0: SEMEN FRESCO, T1: BTS, T2: TRIS) de 20 repeticiones respectivamente. Las pajillas de 0.25 ml fueron evaluadas a los 4 días posteriores a su congelación, fue descongelado en baño maría a una temperatura de 37°C durante 30 segundos. Los valores obtenidos de la variable motilidad masal y espermatozoides vivos fueron evaluados por medio de un análisis de varianza utilizando a una $p < 0.05$ y las diferencias entre medias mediante la prueba de Tukey. Los resultados indican que se obtuvo un porcentaje de motilidad masal de semen en fresco de 83.40% (9 meses) y 81.05% (36 meses), y una relación de espermatozoides vivos de 82.10 % (9 meses) y 80.35 % (36 meses). El resultado para la variable motilidad masal al post descongelamiento, el mejor porcentaje se obtuvo con el dilutor BTS presentando un 45.15% (9 meses) y 43.91% (36 meses) de motilidad masal, porcentajes que son superiores al dilutor TRIS que se obtuvo 37.95% (9 meses) y 35.97% (36 meses) de motilidad masal, existiendo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Para el resultado de la variable espermatozoides vivos al post descongelado, se obtuvo con el dilutor BTS presentando un 48.65% (9 meses) y 46.95% (36 meses), resultados que son superiores al dilutor TRIS que se obtuvo 45.10% (9 meses) y 43.99% (36 meses) de espermatozoides vivos con diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Finalmente se llegó a la conclusión con los resultados obtenidos en la investigación indicaron que hubo mejor motilidad masal y espermatozoides vivos post descongelamiento con el dilutor BTS en comparación con el TRIS.

Palabras clave: Diluyente, semen, verraco, congelación, criopreservación espermatozoides.

SUMMARY

The present study was carried out in the Laboratory of Reproductive Biotechnologies of the National University of Huancavelica. The objective of the present study was to determine the effect of two dilutores on the criopreservación of hog semen, for the realization of the work those were used ejaculated of two hogs of improved race, the semen of the hogs was obtained previous training in a pony, the collection frequency was twice per week in hours of the morning. The obtained samples were taken to the laboratory to evaluate their microscopic characteristics and to determine if it was capable for their freezing and to dilute in BTS and TRIS for the freezing. This samples grouped aleatorily in two treatments (T0: FRESH SEMEN, T1: BTS, T2: TRIS) of 20 repetitions respectively. The pajillas of 0.25 ml was evaluated to the 4 later days to their freezing, it was defrosted in bathroom maría to a temperature of 37°C during 30 seconds. The obtained values of the variable motility masal and alive sperms were evaluated by means of a variance analysis using to a $p < 0.05$ and the differences among stockings by means of the test of Tukey. The results indicate that a percentage of motility masal of semen was obtained in fresh of 83.40% (9 months) and 81.05% (36 months), and a relationship of alive sperms of 82.10% (9 months) and 80.35% (36 months). The result for the variable motility masal to the one post descongelamiento, the best percentage was obtained with the dilutor BTS presenting 45.15% (9 months) and 43.91% (36 months) of motility masal, percentages that are superior to the dilutor TRIS that 37.95% was obtained (9 months) and 35.97% (36 months) of motility masal, existing difference significant statistic ($p < 0.05$). For the result of the variable alive sperms to the one post having defrosted, it was obtained with the dilutor BTS presenting 48.65% (9 months) and 46.95% (36 months), results that they are superior to the dilutor TRIS that 45.10% was obtained (9 months) and 43.99% (36 months) of alive sperms with difference significant statistic ($p < 0.05$). Finally you reached the conclusion with the results obtained in the investigation they indicated that there were better motility masal and alive sperms post descongelamiento with the dilutor BTS in comparison with the TRIS.

Words key: Diluter, semen, hog, freezing, criopreservación sperms.

INTRODUCCIÓN

En producción animal, los cerdos constituyen una de las especies más importantes en la economía pecuaria de la mayor parte de los países desarrollados del mundo. Para poder equilibrar las necesidades del consumo de carne es necesario dedicarse cada vez más a la producción de aquellos animales que garanticen una producción más rápida y que sus productos puedan comercializarse en proporciones industriales para la alimentación humana (Saez, 1988).

La criopreservación espermática es una técnica que se ha desarrollado, sobre todo, para satisfacer dos necesidades fundamentales. En primer lugar, la conservación del material genético valioso por tiempo indefinido, aplicación con la que contribuye de manera importante a la conservación de razas o especies animales en peligro de extinción. En segundo lugar, el desarrollo de la inseminación artificial (IA), lo que representa, quizás, su aplicación por excelencia, y en la que se utiliza como un instrumento de mejora genética (Córdova et al., 2000).

La congelación del semen de verraco, es un procedimiento que permite conservar a los espermatozoides por tiempo indefinido, transportar a largas distancias y de esta forma poder lograr un mejoramiento genético de la porcicultura, en lugares lejanos, sin tener la necesidad de transportar a los sementales. Por otra parte podría ser más barato adquirir el semen congelado, que un macho reproductor de calidad genética comprobada debido al costo que implica a su mantenimiento (Brackett *et al.*, 1988).

En ese sentido la presente investigación como objetivo tiene evaluar el efecto de dos dilutores sobre la viabilidad espermática en semen congelado de verraco.

Los autores.

91

CAPÍTULO I

PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La crianza de porcinos en el Perú, ha llevado a la evolución de su crianza, pasando de formas de producción doméstica hacia formas de producción más intensivas, desarrollándose un mejoramiento genético en razas especializadas para carne, en la región de Huancavelica es considerado como una actividad complementaria, esperando obtener algunos beneficios de esta explotación y así elevar el nivel de vida de las personas de bajos recursos económicos, quienes no lo realizan con la seriedad que demanda la crianza de este animal, normalmente se tiene razas rústicas y autóctonas, con un limitado poder de transformación, bajos índices reproductivos, no habiendo animales de calidad genética y no aplicándose la inseminación artificial en esta especie, claro esto involucra invertir tiempo y especialmente dinero por parte del criador huancavelicano, obteniendo como resultado un comportamiento productivo ineficiente.

En la actualidad los estudios realizados sobre manejo reproductivo en porcinos, siguen desarrollándose para mejorar la crianza y de este modo la producción; debido a problemas reproductivos, enfermedades y manejo. Por lo tanto, es imprescindible mejorar las técnicas de conservación de los espermatozoides del cerdo, en cuanto a métodos de congelamiento de éstos, donde el medio es el diluyente que juega un papel muy importante en el congelamiento y recuperación de espermatozoides y en su capacidad fecundante post-descongelamiento.

La precaria situación económica de los criadores de porcinos imposibilita la adquisición de reproductores, pudiendo quedar la inseminación artificial con semen

diluido congelado como una alternativa de solución. No obstante, se tiene que considerar que los resultados de fertilidad del semen diluido y congelado, dependen de las características originales del semen fresco y de los dilutores, para conservación a largo plazo del semen es económicamente importante y altamente deseable para mantener y conservar germoplasma, preservar la diversidad genética y mejorar la eficiencia reproductiva.

Por todo lo planteado anteriormente y revisadas las bibliografías y al no encontrar datos referentes al uso de dilutores y la criopreservación de semen de verraco, a una altura de 3700 m.s.n.m.; bajo estas consideraciones dentro de la política de la investigación se presenta la siguiente interrogante como problema de investigación.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es el efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco?

1.3 OBJETIVO

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco.

1.3.2 Objetivo Específicos

- Determinar la motilidad masal post descongelamiento
- Determinar espermatozoides vivos post descongelamiento

1.4 JUSTIFICACIÓN

La congelación del semen de verraco, permite preservar el mayor tiempo posible su viabilidad y capacidad fecundante; facilitando, entre otros, el control sanitario, optimización en el uso de sementales de alto valor genético, aceleración de programas de selección y mejora de razas. La conservación a largo plazo del semen es económicamente importante y altamente deseable para mantener y conservar germoplasma, preservar la diversidad genética y mejorar la eficiencia reproductiva de

los animales, la dilución del semen fresco de cerdo con dilutores permitirá aumentar el volumen del eyaculado y mantener fértiles y motiles a los espermatozoides.

La ejecución del presente trabajo de investigación permitirá la conservación de semen de verraco mediante la congelación, y la evaluación post congelamiento (motilidad espermática y espermatozoides vivos) los cuales servirán de base para un plan de mejoramiento genético en la crianza de los porcinos.

Aparte de las justificaciones técnicas anteriormente indicadas, desde un punto de vista estratégico, el proyecto encaja dentro de la política de investigación nacional, regional, local de instituciones involucradas con prioridad en el desarrollo del sector pecuario, habiéndose hecho hasta la fecha esfuerzos individuales que no tienen repercusión de importancia social, ni económica, por lo que se hace necesaria la presentación del proyecto debidamente bien evaluadas y con buen soporte científico.

Los verracos que se vienen utilizando en la provincia de Huancavelica, son provenientes de otras ciudades (Lima, Huancayo), con desconocido valor genético, con diferente tipo de manejo, alimentación y uso; los que se ven reflejados en un menor tamaño de camada.

Los resultados obtenidos serán de gran importancia ya que servirán de apoyo a futuras investigaciones que pretendan evaluar y/o desarrollar técnicas eficaces para conservar el semen de verraco, así como de base para el desarrollo de planes de manejo y mejoramiento genético, ofreciendo una alternativa real y valiosa que permitirá el fortalecimiento genético y económico de los productores.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Cabrera *et al.*, (2011), evaluó el comportamiento de los dilutores Tris-yema y Citrato-yema en el congelamiento de semen de ovino y la integridad de la membrana espermática del semen congelado en pajillas. El estudio se realizó en el Banco Nacional de Semen UNALM con seis carneros de tres razas. El semen se colectó en vagina artificial, se diluyó con Tris -glucosa - yema de huevo de Codorniz (Tris) o Citrato - glucosa - yema de huevo (Citrato), se almacenó en pajillas de 0.5 ml, y se congeló en nitrógeno líquido. El descongelamiento se realizó a 38 °C por 15 segundos. En semen refrigerado, la Motilidad Individual Progresiva (MIP) en semen diluido con Tris fue 82.3% y con Citrato de 79.2%, y los valores de la integridad de membrana (HOST) fueron de 78.0 ± 4.4 con Tris y $73.2 \pm 5.8\%$ con Citrato. En semen descongelado, la MIP fue de 62.0 y 56.8%, y HOST de 49.8 ± 3.9 y $41.3 \pm 3.8\%$ para los dilutores Tris y Citrato, respectivamente, existiendo diferencias significativas entre dilutores, carneros y momentos de procesamiento ($p < 0.01$). Se registraron regresiones lineales significativas ($p < 0.001$) entre MIP del semen refrigerado y HOST de semen descongelado con uso de ambos dilutores. Se concluye que Tris presenta un mejor rendimiento que Citrato para la congelación del semen ovino y que la prueba hipo osmótica permitió evidenciar diferencias entre dilutores, carneros y momentos de procesamiento.

Carpio *et al.*, (2008), evaluaron el efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. Se utilizaron seis eyaculados (dos por

macho), de tres verracos adultos de las razas Hampshire, Duroc y Landrace. Se evaluó el volumen, motilidad y concentración espermática de cada eyaculado. Posteriormente, el semen fue diluido con solución BTS (Beltsville Thawing Solution) y centrifugado a 1500 rpm por 10 min para retirar el plasma. El pellet (porción espermática) obtenido fue extendido con dilutor de congelación (A y B), enfriado y equilibrado a 5 °C por 2 horas previas a la congelación. El semen equilibrado fue criopreservado usando dos métodos de congelamiento: a) en pellets colocando alícuotas de 0.25 ml de semen equilibrado en agujeros preparados en la superficie del bloque de hielo seco manteniéndolo por 2 min y luego vertiéndolo al nitrógeno líquido; y b) en pajillas de 0.5 ml, exponiéndolas al vapor de nitrógeno líquido a 7 cm de altura por 10 min (dentro de una caja de tecnopor) para luego verterlas al nitrógeno líquido. No se encontró diferencias significativas entre la motilidad individual y proporción de espermatozoides vivos del semen congelado en pellets (40.1 y 48.8%) vs. pajillas (34.5 y 40.7%), respectivamente.

Poto *et al.*, (1999), Compararon el método propuesto por Thilmant (A) con el utilizado por Westendorf (B), para ser utilizado en las razas porcinas autóctonas españolas en peligro de desaparición, Chato Murciano e Ibérico, y su conservación *ex situ* en banco de germoplasma. La aplicación del método de congelación de semen porcino propuesto por Thilmant (1997) (A) ha mejorado los resultados alcanzados con el método propuesto por Westendorf (1975) (B). Considerando, a efectos de este trabajo, la tinción vital (T.V.) y el estado del acrosoma (N.A.R.), Se han utilizado en seis verracos pertenecientes a razas autóctonas españolas y un verraco cruzado. El semen ha sido recogido en el vaso sólo o con 100 ml de BTS, según el método (A) de Thilmant (1997) o (B) de Westendorf (1975). Todos los verracos han sido sometidos a una recolección por semana. Para congelación los eyaculados que mostraron una buena calidad en el momento de la recolección (motilidad individual >3, espermatozoides vivos >70% y Acrosoma Normal (NAR) >90%).

Dorado M. J. (2002), Dio a conocer, la respuesta a la congelación-descongelación del macho cabrío de la raza Florida, planteamos un estudio para valorar la influencia del mes, estación del año y temperatura ambiental, utilizando dos diluyentes de diferente composición, siguiendo el mismo protocolo de refrigeración y congelación del espermatozoide en los dos machos durante un año. Asimismo, se realizó una prueba in vivo de la capacidad fertilizante, mediante la espermatización manual (EM) de un lote de 42 cabras, sincronizadas con esponjas vaginales. Los resultados obtenidos revelan que el macho cabrío de la raza Florida, muestra variaciones individuales en los parámetros espermáticos analizados, así como, una ligera estacionalidad de los mismos, pero sin llegar a comprometer la viabilidad de los eyaculados durante los 14 meses de estudio. El proceso de congelación-descongelación, afectó fundamentalmente a los parámetros de movimiento e integridad de acrosoma, apreciándose además variaciones entre individuos. Por otro lado, el diluyente influyó sobre el grado de protección del acrosoma durante el proceso de congelación-descongelación. Se determinó la gestación, mediante exploración ecográfica interna el día 25 post-espermatización, con un índice de fertilidad total del 47,62%, apreciándose una ligera tendencia a existir variaciones individuales, así como, resultados ligeramente superiores para el diluyente lácteo.

Rivera del Alamo M. (2002), determinó cómo afectan los diferentes regímenes lumínicos sobre la calidad seminal de los verracos. Así, para el estudio se utilizaron un total de 30 verracos de fertilidad probada. De éstos, 14 estuvieron sometidos a un régimen de luz natural, mientras que los 16 restantes estuvieron sometidos a un régimen de luz artificial. En el caso del grupo de luz natural, durante la primera mitad del estudio el fotoperíodo natural fue creciente, mientras que en la segunda mitad fue decreciente. En el caso del grupo de luz artificial, durante la primera mitad del estudio los animales dispusieron de un total de 9 horas diarias de luz, mientras que durante la segunda mitad fueron un total de 16 horas diarias. Para evaluar la calidad seminal se determinaron los porcentajes de viabilidad, anomalías morfológicas y ORT, ritmo de producción de L-lactato y motilidad. Dichos análisis se realizaron con el semen fresco diluido y con el semen conservado durante 72 horas a 16°C, pudiéndose evaluar

también el efecto del fotoperiodo sobre la capacidad de conservación del semen. En el análisis de los resultados apenas se observaron diferencias significativas entre los diferentes regímenes lumínicos. El único parámetro que conservó diferencias significativas.

Peinado et al., (1998), realizaron una serie de estudios preliminares sobre las posibilidades de crioconservación de los eyaculados de verracos de la raza porcina autóctona Chato Murciano, que en la actualidad se encuentra en peligro de extinción. A partir de los eyaculados, obtenidos con frecuencia semanales, las dosis seminales fueron sometidas a congelación (Westendorf et al., 1975), envasadas en maxipajuelas de 5 ml y posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido. La evaluación de las muestras se realizó tras la descongelación de las mismas, analizándose los siguientes parámetros: motilidad y calidad de movimiento, integridad estructural de membrana (tinción eosina/nigrosina), estado del acrosoma e integridad funcional de membrana (test diacetato de carboxifluoresceína). Los resultados obtenidos muestran que se deben seguir haciendo estudios para intentar mejorar la calidad del semen congelado descongelado para que esta técnica pueda ser utilizada como una herramienta útil en los planes de recuperación y de conservación de especies y razas.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 MANEJO REPRODUCTIVO DEL VERRACO

A. Ciclo sexual de verraco

La pubertad señala el momento en la vida de un animal, en el que se alcanza la capacidad reproductiva. El macho llega a la pubertad cuando empieza a producir andrógenos y espermatozoides, y sus órganos reproductivos han madurado de tal suerte que el pene está libre de su vaina y permite la cópula con la hembra para preñarla (Sorensen, 1991).

Los verracos alcanzan la pubertad más o menos a los 125 días de edad (Hafez, 1993).

Las primeras eyaculaciones ocurren entre los 5 a 8 meses de edad. El número de espermatozoides y el volumen de semen continúan aumentando durante los primeros 18 meses de vida (Anderson, 1999).

En el momento de alcanzar la pubertad la fertilidad del verraco es baja pero aumenta considerablemente en los meses siguientes, el máximo de fertilidad parece alcanzarse a los 2,5 años de edad, aunque la fertilidad del verraco al año de edad es suficiente para permitir cruzamientos regulares (Camacho, 2000).

B. Producción espermática

El esperma es el resultante en el momento de la eyaculación de una mezcla de espermatozoides, provenientes del epidídimo, con el plasma seminal.

La palabra esperma es sinónimo de eyaculado y, en tal caso el eyaculado es una suspensión celular semigelatinosa resultante de la mezcla de la secreción testicular con las secreciones correspondientes a las glándulas paragenitales o anexas al aparato genital masculino en el momento de la eyaculación.

El eyaculado del verraco se caracteriza por su volumen, alta proporción de material gelatinoso y prolongado período de eyaculación, siendo heterogéneo, tanto por la composición del plasma como por su contenido en las células espermáticas.

La cantidad total de espermatozoides en el eyaculado del verraco es de 15.000 – 50.000 millones (Rivera, 1997).

C. Espermatozoides, semen y plasma seminal

El mecanismo encargado de la formación, almacenamiento y posterior expulsión de los espermatozoides se denomina espermatogénesis. Es la suma de las divisiones mitóticas y meióticas de células espermáticas precursoras que ocurren dentro del túbulo seminífero del parénquima testicular (Muñoz y Paucar, 2005).

Los espermatozoides (gametos masculinos) se forman en los testículos a partir de las células germinativas primitivas, las espermatogonias a partir de

los períodos de multiplicación, crecimiento y maduración; el período de multiplicación se inicia ya durante el desarrollo embrionario, no teniendo lugar la maduración espermática hasta que el macho no alcanza la pubertad (Pérez, 1990).

El período de espermatogénesis dura 34 días y una vez formado el espermatozoide y liberado en el túbulo seminífero, inicia el recorrido del epidídimo, proceso que le toma aproximadamente otros 10 días y durante el cual sufre una serie de cambios en su maduración que le confieren su capacidad fecundante (Martínez, 2006).

Los espermatozoides maduros son células alargadas que constan de una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. La célula espermática está cubierta en su totalidad por el plasmalema o membrana plasmática. El acrosoma o casquete acrosómico, es una estructura de doble pared situada en la porción anterior del núcleo, en su interior se hallan almacenadas diversas enzimas hidrolíticas, y proteínas cruciales para la interacción con el ovocito durante la fecundación. Un cuello que presenta el centrosoma y las mitocondrias, une la cabeza con la cola, la cual a su vez se subdivide en tres segmentos: media, principal y caudal o terminal, que miden de 40 – 50 micrones de largo, constituye la parte más frágil del espermatozoide.

El espermatozoide, para poder ser fecundante tiene que: 1) poseer una óptima movilidad que le permita penetrar el canal cervical, 2) ascender a las partes altas del tracto reproductivo femenino, 3) sufrir la capacitación y la reacción acrosómica, 4) atravesar la zona pelúcida del ovocito y 5) sufrir la recondensación nuclear (Rague, 1999).

Los espermatozoides junto con las secreciones de las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales constituyen el semen. La porción líquida de dicha suspensión que se forma durante la eyaculación se llama plasma seminal (Hafez, 1993).

El semen puro inalterado normalmente aparece como un fluido ligeramente amarillento blanquecino, lechoso con aspecto cremoso cuya consistencia depende del número de espermatozoides, células degeneradas, gránulos lipóideos, corpúsculos hialinos y concreciones (Hermann, 1994).

Las propiedades físicas del semen incluyen, color, volumen, densidad, concentración, viscosidad, pH, presión osmótica, conductividad eléctrica, capacidad de taponamiento. El plasma seminal es para los espermatozoides una fuente de metabolitos y un vehículo. Su origen, su composición, sus características y el control de su producción son complejas y reflejan la actividad de las glándulas anexas (Rivera, 1997).

El plasma seminal es esencial en la mayor parte de los procesos de apareamiento porque sirve de transportador y protector de espermatozoides; contiene concentraciones altas de ácido cítrico, ergotioneína, fructosa, glicerilfosforil colina y sorbitol, también están presentes cantidades apreciables de ácido ascórbico, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos, grasas y numerosas enzimas (Hafez, 1993).

El plasma seminal de los animales de eyaculación de tipo uterino (porcinos y equinos) se caracteriza por un elevado contenido electrolítico, escasa capacidad tampón, gran riqueza en azúcares y elevada dotación enzimática circunstancias que justifican el comportamiento de dicho material en cuando a su capacidad fecundante, tiempo de conservación in vitro, posibilidades de dilución (Camacho, 2000).

D. Entrenamiento del verraco

El entrenamiento del verraco consiste en hacerlo montar a un maniquí o potro y de esa manera poder hacer la colecta de semen. Cuando se inicia el entrenamiento es recomendable utilizar un potro móvil ya que los movimientos estimulan al verraco joven, posteriormente es más fácil trabajar con un potro fijo, el cual debe ser lo bastante cómodo para no dañarlo.

El potro debe de ser impregnado con olores que estimulen su líbido como orine de cerda en celo.

Los verracos pueden ser entrenados con cierta facilidad a que monten a un maniquí de cerda y ellos eyacularán fácilmente sin utilizar las sofisticadas vaginas artificiales (Hughes y Varley, 1984).

Se aconseja empezar el entrenamiento de los verracos a los 5 a 6 meses de edad, 2 a 3 veces por semana y durante 15 minutos (Caicedo y Perez, 1992). El entrenamiento del verraco se inicia a la 26 semana de edad, realizándolo todos los días en sesiones de 10 a 15 minutos hasta obtener la primera colecta. Después de la primera colecta se realizan colectas más espaciadas, como mínimo de 4 días.

Es importante que todo el proceso de entrenamiento sea bajo supervisión del encargado de los verracos para que no se lastimen o adquieran miedo frente al potro. La puesta del servicio del verraco será a partir de las 30 semanas cuando ya se ha evaluado su calidad espermática (Véliz y González, 2001).

Las reacciones de los verracos ante el potro son análogas a las que manifiestan frente a las hembras, como son olfateos y golpes de hocico que preceden el salto, por ello es necesario no sólo consentir estas reacciones sino estimularlas cuando el animal se mantiene distraído (Rivera, 1997).

El entrenamiento consiste en hacer saltar al verraco sobre un potro para poder hacer la extracción del semen. Para realizar el entrenamiento el potro ha de ser fácil de transportar, ligeramente más bajo que la altura de los ojos del verraco por lo que debe tener medidas aproximadas de una cerda primeriza, debiendo ser lo suficiente cómodo para que el verraco no sufra daño y mantenga la estabilidad durante el procedimiento. El potro debe estar impregnado de olores que estimulen la libido del animal, rociando para ello con orina de cerda en celo o semen de otro verraco (Kubus, 1993).

Se debe entonces acercarse sin ruido al verraco desde atrás sin espantarlo, acercársele del mismo lado que la mano que se utiliza para la recolección, se coloca la mano enguantada contra el abdomen ventral del verraco permitiendo que el pene empuje dentro de la mano, se aplica presión digital apretando con los dedos índice y pulgar entre la primera y segunda ranura

del pene, teniendo cuidado de no cerrar toda la mano demasiado ajustada sobre el pene ya que ocasionará que el verraco desmonte debido al dolor (Merck, 1993).

Nunca se debe aflojar la presión en el pene hasta que la eyaculación haya terminado (Caicedo y Perez, 1992).

Es necesario establecer un ritmo de recogida que permita recuperar las reservas espermáticas del epidídimo (Rillo, 1994).

De los verracos jóvenes pueden recogerse eyaculados 1 ó 2 veces a la semana, aunque sin sobrepasar 6 obtenciones por mes. Los verracos con más de un año de edad pueden incluirse ya en el ritmo normal de obtenciones de esperma ósea, que se pasa de las 2 recolecciones por semana y un máximo de 3 eyaculados al mes (Castellanos, 1992).

Dentro del proceso de entrenamiento se deben tomar en cuenta algunos aspectos como los siguientes:

- El "potro" debe ser de altura adecuada, con un poco de movimiento, para llamar la atención del cerdo.
- Una vez que el cerdo ha intentado subirse, es importante no interrumpir el entrenamiento.
- Colocar al macho en un corral adyacente al del "potro" y permitir que observe la colección en un verraco ya entrenado, esto lo estimulará, y empezará a reconocer el área una vez terminada la práctica citada.
- Durante las primeras colecciones, debe tenerse especial cuidado para no causar daño en el pene, por ejemplo, algún roce con el "potro" o demasiada presión, también debe evitarse interrumpir la colección (Martinez, 2006).

E. Colecta del semen

El semen es un fluido que se produce durante la eyaculación, el cual está compuesto de una fracción celular (espermatozoides) y un vehículo fluido en el que están suspendidas las células conocido como plasma seminal (Córdova et al., 2004).

Para el éxito en la colecta de semen se deben tomar en cuenta algunos factores como, preparación del material antes de entrar a la sala de colecta, preparación del verraco, técnica a utilizar para obtener la muestra, etc. La muestra de semen se obtiene de un verraco entrenado, utilizando un maniquí con fijación manual del pene (Gordon, 1997 y Hughes et al., 1984).

Todo material que se utiliza debe ser estéril y a la temperatura del semen que es de 37 °C. La sala de colecta debe estar limpia antes de que entre el verraco, dentro se encuentra el potro o maniquí, en posición fija. Antes de empezar la extracción, se debe limpiar en seco toda el área alrededor del pene y prepucio. Una vez el verraco monta el potro, se debe sostener firmemente el pene extrayéndolo en toda su longitud. El frasco de colecta deberá tener un filtro o gasa para evitar la contaminación de la muestra (Singleton, 2000).

La recolección del esperma constituye una premisa fundamental en la metodología de la inseminación artificial (Pérez, 1990).

Para ello se requiere programar a los machos a intervalos óptimos, prepararlos sexualmente y aplicar técnicas correctas (Hafez, 1993).

El principal requisito durante la eyacuación del verraco es la presión que ejerce el cuello uterino de la cerda sobre la zona espiral del pene. Esto puede ser fácilmente simulado por presión manual del pene en prostitución (Camacho, 2000).

Se han empleado algunos métodos artificiales para recoger el eyaculado completo y el método de recogida puede afectar el volumen y concentración del esperma.

La extracción del semen se debe realizar manualmente en un potro fijo en la sala de recolección, ya que es más higiénico y el animal no corre riesgo de caídas o lesiones con potros inestables. También se ha probado la electroeyacuación aunque no resulta práctica y la vagina artificial. El método manual tiene la ventaja de evitar las reacciones de inhibición de los verracos, así como la producción de eyaculados incompletos por variaciones de

temperatura u otros estímulos inhibitorios ocasionados por la vagina artificial (Rillo, 1994).

Después de haber montado el maniquí, se debe realizar el vaciado de la bolsa prepucial, permitiendo que empuje tres o cuatro veces para sacar el pene del prepucio y buscar la vulva de la marrana.

El eyaculado se recogerá directamente en un vaso de precipitación u otros recipientes desechables situados dentro de un termo para mantener la temperatura cerca a los 37° C a la vez sobre el vaso se colocará una gasa para que durante la recolección se impida la mezcla de la fracción espermática del eyaculado con el gel o tapioca, actuando como filtro (Kubus, 1993).

El esperma colectado se debe proteger del aire, calor, frío, luz, agua o agentes químicos que funcionan como espermaticidas (Moreno, 2000).

El ritmo de recogidas debe de ajustarse a los márgenes de 3 a 7 días siendo adecuadas colectas cada 3 a 4 días en verracos adultos y 1 vez por semana en reproductores jóvenes de menos de 1 año de edad (Camacho, 2000).

El propósito de la recolección consiste en evaluar la libido y evaluar la capacidad de copular y eyacular, además proporciona una muestra del eyaculado (Merck, 1993).

F. Eyaculado y sus fracciones

La emisión consiste en la liberación de los espermatozoides y de los líquidos de las glándulas accesorias hacia el interior de la uretra pélvica (Cunningham, 1997).

La eyaculación en todas las especies constituye la expulsión forzada de semen, el cual está dado por un reflejo por el que se contraen y vacían el epidídimo, la uretra y las glándulas sexuales accesorias del macho (Moreno, 2000).

La eyaculación en los cerdos es de larga duración, de 10-15 minutos (Veliz y Gonzales, 2003).

Los verracos expulsan grandes cantidades de espermatozoides en cada eyaculado y agotan con mayor rapidez sus reservas epididimarias. El volumen total de esperma emitido es de 250 ml aproximadamente y está compuesto de 3 fracciones (Hafez, 1993).

a. Fracción pre-espermática:

Está constituida por secreciones de las glándulas accesorias, principalmente de la próstata, vesículas seminales y grumos procedentes de la glándula de Cowper. Estos grumos de textura gelatinosa, reciben comúnmente el nombre de "tapioca", y cumplen la función de tapón del cuello uterino impidiendo el retroceso. Esta fracción es transparente, sin espermatozoides, con alto contenido bacteriano y un volumen aproximado entre 10-35 ml (Rillo, 1994).

b. Fracción espermática:

También se le conoce como fracción rica en espermatozoides, es de color blanco lechoso. Constituida por una gran concentración de espermatozoides y secreciones de la vesícula seminal y próstata, tiene un color blanquecino-lechoso y su volumen oscila entre 50 - 150 ml. El volumen es variable dependiendo de los factores que influyan en la producción espermática (raza, edad, nutrición, ritmo, método de recogida, etc.) (Castellanos, 1992).

La concentración espermática de esta fracción es de 5×10^6 a 13×10^6 espermatozoides/mm³. (Rivera, 1997).

c. Fracción post-espermática:

Es pobre en espermatozoides, constituida por secreciones de la próstata y glándula de Cowper (tapioca). Es de color blanquecino transparente, con grumos gelatinosos y un volumen de 200 ml o más.

Constituida principalmente de secreciones de la próstata y glándulas de Cowper, pobre en espermatozoides, de color blanquecino transparente, con grumos gelatinosos a lo largo de su emisión, con volumen aproximado de 200 mm³ (Rivera, 1997).

La eyaculación se completa en 5 – 10 minutos, con una media de 8 minutos. Un verraco da en 6 minutos cerca de 300 ml de esperma conteniendo 95×10^9 espermatozoides (Rivera, 1997).

2.2.2 EVALUACIÓN DEL SEMEN

La evaluación de la calidad espermática debe hacerse rápidamente, utilizando material limpio, estéril y a la misma temperatura a la que se encuentra la muestra de semen. La valoración de las características seminales es fundamental, ya que de ello depende el éxito de emplear el semen para inseminación artificial. Este examen debe realizarse lo antes posible, luego de terminada la colecta, llevándose a cabo una evaluación macroscópica y microscópica (Gadea, 2003).

El objetivo óptimo de las pruebas de calidad consiste en predecir adecuadamente la fertilidad del semen mediante el empleo de técnicas rápidas y baratas (Cole y Cupps, 1998).

La evaluación del semen tiene gran importancia para diagnosticar si los espermatozoides cualitativa y cuantitativamente, están con total capacidad fecundante o por el contrario no lo debemos utilizar (Rillo, 1994).

2.2.2.1 Evaluación macroscópica

Las muestras de semen se evalúan en cuanto a sus características físicas:

A. Temperatura

Existen varios aspectos importantes en cuanto al factor de temperatura de una evaluación de la calidad espermática. La temperatura debe medirse y registrarse, usualmente se encuentra entre 35 y 37°C. Debe descartarse cualquier eyaculado con una temperatura de 34°C o menor. El semen colectado debe de mantenerse en baño María durante toda la evaluación de la calidad espermática, la cual no debe exceder 15 minutos. Cualquier fluctuación en la temperatura del semen reduce la viabilidad del esperma, 2 a 3 °C arriba o debajo puede reducir hasta un día la viabilidad (Maqueda, 2001).

B. Volumen

El volumen de la fracción rica en espermatozoides oscila entre 50-125 ml y puede determinarse con la utilización de recipientes tarados o graduados para la colecta. Al obtener la muestra y pesarla, pero también se pueden utilizar bolsas plásticas y probetas graduadas.

El volumen varía según la edad, tamaño testicular, raza y el estado fisiológico de cada verraco, entre 50 a 150 ml de fracción espermática y un eyaculado de 250 ml, aproximadamente (Calderón, 1998).

El volumen normal para verracos jóvenes de 8 a 12 meses es de 100 a 300 ml; para los mayores de 12 meses de 100 a 500 ml. (Merck, 1993).

C. pH

El pH del semen de verraco tiene un amplio rango, dependiendo de qué porción del eyaculado sea medida. La fracción rica del semen tiene un pH que va desde 6.8 hasta 7.4. La fracción post- espermática del semen en cambio se encuentra entre 7.0 y 7.6 (Maqueda, 2001).

El pH del eyaculado de un verraco depende de la proporción de constituyente aportado de las glándulas anexas. Puede variar su valor por manipulación, tiempo, contaminación bacteriológica, concentración, etc. Debe medirse inmediatamente obtenido el semen (Caicedo y Pérez, 1992).

Para un eyaculado recién obtenido se admiten valores de 6.4 a 7.4 (Camacho, 2000).

D. Viscosidad

La viscosidad del esperma del verraco varía dependiendo de las glándulas genitales de donde procede la secreción y de si estas poseen contenido en espermatozoides. Dentro de la fracción no gelatinosa, la viscosidad es proporcional a la concentración en espermatozoides (Rivera, 1997).

E. Características organolépticas

La evaluación organoléptica de la muestra de semen se realiza sencillamente viendo las siguientes características:

➤ **Color**

Tiene que ser blanco lechoso, aunque en algunos casos es de color amarillo pálido en casos normales. Una coloración roja oscura o café nos indica la presencia de sangre (Veliz y González, 2003).

Varia de un blanco cremoso a un blanco lechoso, pero en todo caso su apariencia ha de ser opaca, lo que indica una gran concentración de espermatozoides (Rivera, 1997).

➤ **Presencia de impurezas**

La muestra de semen debe estar libre de impurezas, como rastros de tierra, pelo, etc. Para lograr esto, debemos cubrir nuestro recipiente de colecta con un filtro o doble gasa.

➤ **Olor**

Esta debe presentar un olor típico y característico del semen de verraco. Si percibiéramos un olor que no pertenece, indicaría contaminación con orina, fluido prepucial o alguna alteración patológica del tracto reproductivo (Veliz y González, 2003).

El olor del semen del verraco es sui generis y se caracteriza por estar afectado ligeramente por las feromonas del aparato genital.

El semen tiene su propio olor en el caso de estar contaminado por orina o secreciones prepuciales adquiere un olor muy fuerte característico (Camacho y Morejon, 2000).

2.2.2.2 Evaluación microscópica

Este incluye un cálculo de la proporción de espermatozoides con motilidad activa, concentración, y relación vivos-muertos (Hafez, 1996).

A. Motilidad

Indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides, se valora la motilidad individual. Esta evaluación es cuantitativa y cualitativa, ya que se valora el porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100%) y la calidad se determina en una escala de 0 a 5, según el tipo de movimiento (Hafez, 1996).

Para observar la motilidad se coloca una gota del eyaculado sobre un portaobjetos poniéndole encima un cubreobjetos. Ambos deben estar atemperados a 37° C.

Es la valoración cuantitativa del movimiento de los espermatozoides. La observación de la motilidad deberá realizarse inmediatamente después de la recogida ya que los espermatozoides de ésta pierden rápidamente el movimiento al disminuir la temperatura, aunque sólo de forma transitoria, presentando acinesis. El observar las muestras por el microscopio para establecer la motilidad y ritmo de este, proporciona una medida efectiva del nivel de fertilidad de la muestra en particular (Rivera, 1997).

B. Motilidad masal

Luego de la recolección, se coloca en un porta objetos una gota de semen y se observa la microscopio con el lente de menor aumento, a temperatura de 25 a 35° C, para lo cual hay que trabajar en platina atemperada, sin utilizar cubre objetos.

La motilidad en masa indica la concentración y viabilidad de las células espermáticas (Caicedo y Pérez, 1992).

Debe evaluarse en términos del "movimiento de ondas" fenómeno que se debe a la concentración y alta proporción de espermatozoos en movimiento activo. Los remolinos formados en la gota crean movimientos sincrónicos de grupos de células, lo que resulta en

52

bandas claras, oscuras y crea más remolinos.

La actividad del movimiento ondulatorio puede dividirse en 4 categorías:

- 1.- Muy bueno: torbellino intenso con ondas oscuras y claras
- 2.- Bueno: ondas en torbellino más lentas, no tan intensas
- 3.- Regular: movimiento lento con menos ondas
- 4.- Malo: muy poca actividad en torbellino o ninguna. (Merck, 1993)

C. Motilidad individual

Para observar el movimiento individual de las células se mezcla una gota de semen con un pequeño volumen de una solución salina fisiológica y se observa al microscopio bajo un cubre objetos, con lente de gran aumento (40 X) (Pérez, 1990).

El movimiento individual se observa rectilíneo y progresivo además del porcentaje de espermatozoides que se mueven. Se requiere como mínimo para un eyaculado un movimiento progresivo de 70 % (Jara, 2000).

Se calcula como porcentaje y se puede clasificar como muy buena: 80%; buena: 60-80%; regular: 40-60%; pobre: 20-40% y muy pobre: menos de 20%. El movimiento ondulatorio puede disminuir debido a una disminución de la concentración y/o de la motilidad (Merck, 1993).

Clasificación del Movimiento Individual

- 0 : Inmóviles o muertos.
- 1 : movimiento pobre, la cabeza del espermatozoide queda fija y sólo se mueve la cola, pudiendo girar sobre sí mismos.
- 2 : Los espermatozoides se desplazan en círculos más o menos amplios y algunos progresivos.
- 3 : Movimientos progresivos lentos y ondulatorios.

4 : Movimientos progresivos cortos y rápidos.

5 : Movimientos progresivos rectilíneos muy rápidos (Córdova *et al.*, 2004).

D. Concentración

Es la determinación del número de espermatozoides por unidad de volumen en el eyaculado. La valoración de este parámetro es fundamental, ya que junto con el volumen del eyaculado sirve para determinar el número de dosis seminales. Se emplean varios métodos para la determinación, siendo los más usuales el recuento en las cámaras de Burkner, Neubauer o Thomaney y la fotolorimetría.

El recuento en cámara es el método más recomendado en los centros de I.A. por su sencillez y exactitud. Esta técnica de recuento directo consiste en la utilización de un hemocitómetro (cámara de Neubauer). El conteo se realiza directamente en el microscopio contando los espermatozoides de cinco cuadros grandes del rayado de la cámara en ambos lados (Córdova *et al.*, 2004).

El cálculo de la concentración del eyaculado debe hacerse de forma precisa, especialmente para preparar dosis de inseminación con la máxima fertilidad posible y el mínimo número de espermatozoides necesario (Boixo, 1994).

El cálculo del número de espermatozoides por unidad de volumen es el más importante criterio para la evaluación potencial de un macho. La concentración es determinada usando un hematocitómetro o cámara de Neubauer después de una apropiada dilución (Rivera, 1997).

En la actualidad el número de células espermáticas se determina por medio de un espermiodensímetro o cámara de Karras. La medida está basada en la turbiedad de una suspensión de semen en las

diferentes concentraciones leídas en la cámara del densímetro (Minitube, 2006).

La cifra media de concentración del eyaculado completo del verraco es de 300.000 espermatozoides por mm^3 (Camacho y Morejon, 2000).

Un aspecto importante a considerar durante el proceso de conservación lo constituye la concentración. La concentración entre 3000 y 7000 $\times 10^6$ de espermatozoides / dosis de 100 ml de semen diluido resultan favorables (García, 1994).

E. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos

Para observar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se hace un frotis de semen con eosina. Se observan bajo el microscopio, con el objetivo 40X, de 15 a 20 campos contando un total de 200 células. De ellas se saca el número de células vivas y el número de células muertas y se calcula su porcentaje. Se considera un buen eyaculado aquel que presenta por lo menos 80% de espermatozoides vivos (Véliz y Gonzales, 2003).

Se usa una solución de eosina al 5% en solución salina y nigrosina al 10% en solución salina. Se mezcla en un portaobjetos templado una gota de semen con dos gotas de solución de eosina-nigrosina y se hace una extensión sobre el portaobjetos retirando el colorante sobrante. Normalmente el semen tiene una media de 25 % de espermatozoides muertos (García *et al.*, 1998).

Los espermatozoides vivos y muertos pueden diferenciarse por su forma de reaccionar a determinados colorantes; los espermatozoides inmóviles, aparentemente muertos se tiñen por el colorante debido a que su membrana plasmática se hace permeable a este, mientras que los móviles no presentan tinción ya que membrana plasmática actuará a modo de barrera impidiendo el paso del colorante

(Caicedo y Perez, 1992).

Las coloraciones vitales de tripán azul al 2% y de eosina-nigrosina al 5% son las más usadas. (Rivera, 1997).

2.2.3 DILUYENTE

Por diluyente entendemos a la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo el nivel de fertilidad adecuado (Maqueda, 2006).

El diluyente o extensor de semen no es más que una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado y preservar la viabilidad de los espermatozoides por más tiempo, ya que un semen sin diluir tiene una viabilidad entre 2 y 24 horas después de la eyaculación, pero mediante la adición de los diluyentes esas cifras se pueden elevar considerablemente (Hughes y Varley, 1984).

El extensor de semen es la solución que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003).

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto genital femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un periodo de tiempo muy limitado. Para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura (Le Coz, 2005).

A nivel práctico en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación a corto plazo (1 - 3 días), o aquellos que tienen por objetivo la conservación a

largo plazo (más de 4 días). Los primeros se utilizan principalmente en estructuras de distribución de las dosis seminales a corta distancia mientras que los de largo plazo son propios donde la distancia entre el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado es grande (Gadea, 2003).

Las ventajas que aportan los diluyentes de larga duración son la posibilidad de transporte a largas distancias, permiten realizar pruebas diagnósticas sobre el semen antes de ser utilizadas, como pruebas mediante técnicas PCR (Polymerase Chain Reaction) para detectar la presencia de diversos virus o análisis completos de la calidad seminal, permite una mejor organización de las tareas en los centros de recogida seminal y facilita en gran medida la distribución de las muestras a las granjas de reproducción.

Algunos de los factores a considerar en la elección del diluyente son la relación entre su precio y calidad, la temporada del año influenciada por la temperatura y fotoperíodo, así como el tiempo de transporte del semen y el tiempo que pasa entre la producción del mismo y la inseminación, aunque la vida media del semen también se ve afectada por factores como la calidad de semen, la frecuencia de recolección, la tasa de dilución y de las fracciones de semen colectadas (Maqueda, 2006).

2.2.3.1 Ingredientes y funciones del diluyente

Básicamente los diluyentes proveen una fuente adecuada de nutrientes, un ambiente que protege a los espermatozoides contra la disminución de la temperatura, electrolitos para mantener una adecuada presión osmótica, sustancias buffer que protege al semen contra cambios extremos de pH y antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano (Gordon, 1997 y Maqueda, 2001).

2.2.3.2 Requisitos que debe cumplir un diluyente

- Abastecer nutriente como fuente de energía
- Proteger a las células espermáticas del shock térmico

- Proporcionar un amortiguador para prevenir los cambios dañinos en el pH cuando se forma ácido láctico
- Mantener la presión osmótica adecuada y el equilibrio electrolítico correcto
- Inhibir el crecimiento bacteriano
- Aumentar el volumen del semen de tal manera que pueda usarse para múltiples inseminaciones
- Proteger las células espermáticas durante la congelación (Hafez, 1993).
- Proporcionar capacidad tampón contra productos metabólicos
- Los medios diluyentes, conservadores de esperma para uso en inseminación artificial deben cumplir la exigencia de una fácil preparación y ser interesantes en el aspecto económico (Pérez, 1990).

Los diluyentes de semen normalmente contienen:

A. Nutrientes

El espermatozoide tiene capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar el movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más frecuentemente utilizada en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque otras fuentes como galactosa, fructosa, ribosa y trealosa han sido utilizadas sin tener muchas ventajas sobre la glucosa (Maqueda, 2006).

B. Buffers

El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a 7.4 \pm 0.2, al igual que otros fluidos orgánicos, y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del

espermatozoide y su motilidad. El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide (carbohidrato principal es glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso, por lo que las sustancias buffer son necesarias en la preservación del semen ayudando a controlar el pH (Maqueda, 2006).

Buffers simples como el bicarbonato de sodio y el citrato (sódico) tienen una acción limitada, mientras que sustancias como el ácido 3N-Morfolino propanesulfónico (MOPS) o el ácido N-2-hidroxietil piperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES), TES Y TRIS pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (MOPS Y HEPES) (Gadea, 2003).

C. Electrolitos

El plasma seminal del verraco presenta una presión osmótica de 290-325 mOsm, 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 la motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm, mientras que cuando se reduce por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad (Maqueda, 2001).

Los diluyentes isotónicos (300 mOsm) o ligeramente hipertónicos son los que mejores resultados han dado en condiciones de utilización comercial. Para regular la presión osmótica se utiliza principalmente sales de iones inorgánicos como el cloruro sódico y cloruro potásico (Gadea, 2003).

D. Antibióticos

En la mayoría de los casos el tejido testicular y las glándulas accesorias del verraco están libres de bacterias y por tanto la contaminación bacteriana del eyaculado se produce durante el proceso de recogida seminal.

Para controlar el crecimiento microbiano en el diluyente es necesario añadir un agente antibiótico, ya que los componentes del diluyente (glucosa) así como la temperatura a las que se conservan las dosis (15-16° C), permiten el crecimiento de la mayoría de bacterias gram negativas (Rillo, 1994).

La contaminación bacteriana principalmente produce una serie de alteraciones entre las que se encuentra una disminución de la motilidad, aglutinaciones espermáticas, aumento del porcentaje de acrosomas alterados y una reducción del pH hasta niveles ácidos (5.7-6.4), que conducen a una reducción en el tiempo de conservación de las dosis seminales. Por tanto, la adición del antibiótico en la adecuada concentración favorecerá la supervivencia espermática y se incrementarán los resultados de fertilidad. (Gadea, 2004).

Los antibióticos más utilizados actualmente son sulfato de gentamicina, sulfato de neomicina, penicilina sódica, lincomicina, y espectinomicina (Minitube, 1999).

E. Estabilizadores de membrana

Se adicionan con el fin de prevenir o retardar alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas de los espermatozoides. Las principales sustancias utilizadas son seroalbúmina bovina (BSA), hidroxitolueno butilado (BTH), etilén disódico diamino tetraacetato (EDTA), polivinil pirrolidona (PVP-40), y alcohol polivinílico (Maqueda, 2001).

La diversidad de fórmulas, comprobadas con buenos resultados para diluir y conservar el semen durante varios días permiten garantizar la capacidad fecundante del eyaculado, sin embargo, no resulta suficiente sólo conocer las formulaciones, en ocasiones la mala preparación del diluyente bien sea por error en el pesaje de reactivos, utilización de productos de mala calidad incluyendo agua, la contaminación de los elementos que integran el proceso de manipulación y preparación del diluyente provocan daños irreversibles a la célula después de la dilución que repercute en la fertilidad (Rivera, 1997).

2.2.4 DILUCIÓN DEL SEMEN

La dilución del esperma persigue el aumento del volumen eyaculado y en consecuencia el rendimiento de este en la inseminación artificial, sin perder la bondad del mismo. Los métodos diluyo conservadores son interesantes al pretender aumentar el volumen del material recolectado y, al mismo tiempo, rodean a los zoospermos de condiciones óptimas para el mantenimiento de la vitalidad y capacidad fecundante a través del tiempo. (Pérez, 1990).

La adición de un medio de dilución en reemplazo del plasma seminal es necesaria para mantener la integridad de la célula espermática; puede ser el medio para evitar una baja motilidad, acrosomas dañados, formas anormales, aglutinaciones espermáticas, proteicas y de sales, sin olvidar las contaminaciones; siendo fundamental para poder mantener los parámetros de fertilidad y prolificidad (Rillo, 1994).

Los medios artificiales diluyo conservadores deben proporcionar a los espermatozoides el material energético adecuado para la conservación de la vitalidad espermática, así como las condiciones biofísicas necesarias para la persistencia de aquellos en el medio líquido sin peligro de precipitación, regulando además, la presión osmótica, manteniendo el pH y la no modificación

de la carga eléctrica en los zoospermos, como condiciones fundamentales. (Perez, 1991).

Los factores que pueden alterar o dañar a los espermatozoides son:

- Oxígeno: Es un factor que provoca excitación en los espermatozoides, que hace se muevan, con lo que el movimiento los agota, elimina sus reservas y estos mueren.
- Temperatura: El espermatozoide sale a una T° aproximada de 37°C . De ahí para abajo se conserva bien; si bajamos hasta la congelación el aguante depende de la especie; en porcinos es de 12 a 15°C . Pero una T° de 42°C para arriba destruye totalmente a los espermatozoides, pues sus estructuras proteicas se coagulan.
- Acción de sustancias químicas: Pueden provocar el llamado shock químico. Estas sustancias pueden estar como residuos en aparatos recolectores, que parece que puedan estar limpios, pero luego aparecen y reaccionan.
- Luz: La luz intensa, sobre todo el rayo de sol directo, debido al contenido de infrarrojos elimina los espermatozoides. La luz intensa activa al espermatozoide igual que el oxígeno, con lo que se fatiga y muere.
- pH: Un pH alcalino provoca una excitación igual que el oxígeno. Un pH ácido paraliza al espermatozoide.
- Características del agua: Se recomienda el uso del agua biodestilada sin agentes pirógenos. El agua de uso corriente es muy dañina (Rodríguez y Martínez, 2000).

La determinación rigurosa de la concentración del volumen, del porcentaje de células vivas es esencial para calcular cuál es la máxima dilución de espermatozoides en los preparados para la inseminación artificial (Rivera, 1997). Una vez conocida la concentración / mm^3 se calcula el número de dosis que se obtienen de ese eyaculado (Kubus, 1993).

El título idóneo se considera entre 1:8 o 1:12, concentraciones superiores producen aumento de acrosomas dañados (Rivera, 1997).

La dilución se hace de 30 a 37 ° C y dentro de las 2 primeras horas después de la recogida. Un periodo entre 3 a 5 horas para el enfriamiento de 38 a 15 ° C permite una conservación óptima del semen (Rillo, 1994).

Se añade el volumen del diluyente a 37 ° C sobre el semen para obtener el número de dosis posibles de 100 ml y concentración de 3×10^9 cada uno. Antes de mezclar se debe comprobar que no exista diferencia de temperatura entre el semen y el diluyente; el semen almacenado debe ser rotado suavemente cada 12 horas para mantener a los espermatozoides en suspensión con el diluyente. (Kubus, 1993).

2.2.5 ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DEL SEMEN

A. Envasado del semen diluido

Antes de envasar el semen en la botellas de inseminación artificial debe de observarse una muestra al microscopio, para verificar que la dilución se llevó a cabo correctamente y que el semen está en perfecto estado. El semen se vierte suavemente dentro de las botellas, las cuales deben taparse después de desalojar el aire dentro de las mismas para evitar la presencia de oxígeno. Cada botella se identifica con el número del verraco, la fecha y hora de la recolección (Berrios, 1981).

B. Almacenamiento

El tiempo en que el semen está almacenado y el número de células espermáticas por dosis parece reducir el tamaño de la camada solo cuando se utiliza una dosis de 5,000 millones de espermatozoides por dosis después de un período de almacenamiento superior a las 48 horas.

C. Conservación del semen diluido

Se entiende como semen conservado aquel que puede ser conservado al menos un día después de su recogida, mientras que el semen fresco se utiliza diluido o no, inmediatamente después de haber sido recogido, manteniéndose a una temperatura de 37 ° C hasta el momento de la inseminación (Perez, 1991).

La temperatura óptima para la conservación 15 a 20 ° C en un medio salino. El mayor éxito se alcanza en el acondicionamiento de un refrigerador tipo servidor que con un buen termostato conservan adecuadamente la temperatura. El almacenamiento se lo hace en frascos de cristal de 550 ml, en bolsas recolectoras de semen de polietileno o frascos de polietileno de 100 ml (Camacho, 2000).

Para conservar el semen de verraco por más de dos a tres horas, es necesario añadir al esperma un medio que equilibre la acción de las sustancias del plasma seminal, manteniendo las células en condiciones de inactividad metabólica, tal como se encontraban en el epidídimo, para poder recuperar posteriormente su actividad en el momento de la inseminación (Rivera, 1997).

2.2.6 CONGELACIÓN DEL SEMEN

La tecnología de la crio preservación del semen porcino se desarrolló en la década de 1970; (Polge *et al.*, 1970) informó la primera fecundación exitosa con semen congelado. Desde dicha fecha hasta nuestros días, esa tecnología ha evolucionado de manera sorprendente permitiendo obtener, en determinadas ocasiones, resultados de fertilidad y prolificidad compatibles con las exigencias actuales del mercado.

Sin embargo una serie de factores contribuyen a la falta de difusión de esa tecnología; entre ellos, la necesidad de contar con un laboratorio moderno destinado al procesamiento del semen, manejo cuidadoso de las dosis seminales durante el almacenamiento y la descongelación, variabilidad de los resultados según los verracos, y protocolos de inseminación diferentes al utilizado en semen fresco. De hecho, la utilización del semen congelado se encuentra por el momento restringida a la exportación de semen entre países distantes y la conservación de las líneas o razas que ya se encuentran en vías de extinción o en riesgo sanitario (Decuadro, 2001).

2.2.7 DESCONGELACION DE SEMEN

La temperatura y tiempo de descongelación varía dependiendo del tipo de envase elegido (Salamon y Maxwell, 1995), no existiendo uniformidad de criterios entre los diferentes autores para un mismo envase, si bien se ha demostrado que las descongelaciones a altas temperaturas durante escasos segundos muestran mejores resultados (Fiser *et al.*, 1981; Salamon y Maxwell, 1995).

La viabilidad de las dosis descongeladas va a ser un sumatorio de los procesos de dilución, refrigeración, glicerolización, congelación y descongelación, cuyo resultado final es una pérdida de movilidad, vitalidad, morfoanomalias, acrosomas, permeabilidad de membrana, y por consiguiente de la fertilidad (Correa *et al.*, 1996).

2.3 HIPÓTESIS

Ha: Existe efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco

Ho: No existe efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco.

2.4 VARIABLES DE ESTUDIO

2.4.1. Variables independientes

- Dilutores (BTS y TRIS)

2.4.2. Variables Dependientes

- Motilidad masal
- Espermatozoides vivos

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente estudio de investigación se ejecutó en dos etapas: de campo y laboratorio.

La primera etapa en campo, en la Granja Experimental de Porcinos de la Escuela Académica Profesional de Zootecnia de la Universidad Nacional de Huancavelica, situado en el distrito y provincia de Huancavelica, a 12° 47' 06" de Latitud Sur y a 74° 58' 17" de Longitud Norte, a una altitud de 3 690 m.s.n.m., y en la Granja de Porcinos del Asilo de Ancianos "Santa Teresa de Jornet", situado en distrito de Ascensión y provincia de Huancavelica, a 12°47'03" de Latitud Sur, 74°58'50' a Longitud Oeste y a una altitud de 3 693 m.s.n.m.

La segunda etapa en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, donde realizaron todas las evaluaciones de la muestras.

3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Aplicada

3.3 NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Explicativo

3.4 MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

Inductivo: Es un modo de razonar que nos lleva de lo particular a lo general o de una parte a un todo (Sánchez y Reyes, 1998).

3.5 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Experimental

3.6 MUESTREO

Muestreo: no probabilístico de tipo circunstancial, porque es aquel en el cual no se conoce la probabilidad o posibilidad de cada uno de los elementos de la población de poder ser seleccionado en una muestra (Sánchez y Reyes, 1998).

3.7 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La recolección de datos se realizó a través de la técnica de observación directa estructurada y como instrumento se utilizó fichas de registro de datos y lo siguiente:

3.7.1 Materiales y equipos

3.7.1.1 Materiales

a. Campo

Se utilizaron Termo colector, Filtro (con doble capa de gasa), papel toalla desechable, guante para colecta, potro para monta, estufa, olla pequeña, gasa, ligas, termómetro, rotulador, baldes y cuaderno de apunte.

b. Laboratorio

Se utilizaron tubos Falcón, Puntillas de 10 μ l, 20 μ l y 100 μ l, láminas portaobjetos, laminas cubreobjetos, vaso de precipitación de 500 ml, cámara de Neubauer, termómetro, pajillas de 0.25 cc, alcohol polivinílico, selladora de hematocrito, agua bidestilada, pipetas estériles descartables, colorante eosina-nigrosina, diluyente (BTS y TRIS), tanque de nitrógeno líquido de 18 litros, antibióticos, papel toalla, recipientes graduados, guantes quirúrgicos, mascarillas y mandil.

3.7.1.2 Equipos

Se utilizaron microscopio de contraste de fase con 4 objetivos, platina temperada, termómetro digital, baño María, agitador magnético, pipetas graduadas 10 μ l, 20 μ l y 100 μ l, balanza analítica de precisión

0.01 gr. a 200 gr, centrifugadora, Peachimetro, Refrigeradora, Cámara de Neubauer, Cámara fotográfica digital y computadora.

3.7.1.3 Reactivos

a. Para el dilutor

Se utilizaron tris, ácido cítrico, fructuosa, glucosa, citrato de sodio, yema de huevo (fresco no mayor a 03 días), glicerina, penicilina – estreptomicina, EDTA (Ácido Etilen Diamino Tetra Acético), bicarbonato de sodio y cloruro de potasio.

3.7.1.4 Material biológico

Se utilizaron muestras de dos verracos de 9 y 36 meses respectivamente.

3.8 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Para la recolección de datos se tuvo en cuenta los siguientes pasos:

PRIMERA ETAPA

a. Construcción del potro

El potro se construyó con las siguientes medidas: la base es de 1m. de largo por 40 cm. de ancho, con una altura de 60 cm. y la parte superior del potro tiene 70 cm. de largo por 24 cm. de ancho, el material utilizado fue de fierro corrugado de 1 pulgada, tubos de 4 pulgadas en forma de T. La parte superior del potro donde montó el verraco se forro con plástico grueso de 70 cm. de largo por 35 cm. de ancho y frazada doble para que no se dañe el animal.

El segundo potro nos facilitó el personal encargado de la granja de porcinos del asilo de ancianos el cual tuvo las siguientes medidas: la altura es de 80 cm., la parte superior de 1 m. de largo por 28 cm. de ancho, el material utilizado para las patas fue de fierros angulares de 2 pulgadas y la parte superior fue de fierro corrugado de 1 pulgada. La parte superior del potro donde montó el verraco se forro con plástico grueso de 1m. de largo por 38cm. de ancho y frazada doble para que no se dañe el animal.

b. Entrenamiento de verraco

En el presente trabajo el entrenamiento de los verracos fue de 2 a 3 veces por semana y durante 20 a 30 minutos en horas de la mañana, con edades de 9 y 36 meses respectivamente, el entrenamiento consistió en hacerlo montar sobre el potro impregnado con olores de orine de cerda en celo que estimulen su líbido. Para realizar el entrenamiento el potro fue de fácil transporte, y siendo suficientemente cómodo para que el verraco no sufriera daño y mantenga la estabilidad durante el procedimiento.

c. Colecta de semen

La colección de semen se realizó de dos verracos de raza mejorada en un termo colector limpio, estéril, de boca ancha previamente temperada a 37° C con su respectivo filtro (doble capa de gasa) para separar la porción gelatinosa (tapioca) del eyaculado, solo se colectó la porción del eyaculado rica en espermatozoides. el semen se colectó por medio de la técnica Mano Enguantada una vez que el verraco ha efectuado la monta y dejó al descubierto el pene, se colocó el dorso de la mano en el abdomen por delante del orificio prepucial, sujetándolo suavemente y ejerciendo una ligera tracción hacia delante con el fin de lograr su estimulación y la expulsión del semen según Conejo, (1990).

La frecuencia de colección fue 2 veces por semana y se obtuvo en las horas de la mañana; primero se colectó al verraco de 9 meses y luego al de 36 meses de edad, solo se procesaron 20 eyaculados (10 de cada uno) ya que estos cumplían con los parámetros mínimos de 80% de motilidad masal indispensables para ser congelados.

SEGUNDA ETAPA

Inmediatamente después de cada colecta de semen se trasladó al laboratorio y se colocó en Baño María, procediéndose a evaluar por medio de técnicas de laboratorio con el propósito de determinar la calidad seminal.

a. Evaluación macroscópica

El volumen de semen colectado se midió en un vaso graduado (500 ml), el cual

se mantiene en baño María a 37°C para evitar cambios de temperatura.

El valor del pH se determinó introduciendo un peachimetro electrónico y se esperó a que esta enumere y se pudo observar el grado del pH.

b. Evaluación microscópica

- **Motilidad Masal**

Se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos puesto en una platina temperada a 37°C y se le puso un cubreobjetos sobre la gota del semen (aproximadamente 5 µl). En seguida se observó al microscopio de contraste de fase 40X, para estimar la motilidad masal según la rapidez con la que se movían los espermatozoides hacia adelante y en línea recta. La motilidad progresiva masal se estimó en una escala del 0 al 100% (Rivera, 1997).

Además Singleton, (1997) y Garcia et al., (1998) quienes reportaron que un eyaculado de buena calidad debe tener como mínimo 80% de espermatozoides con movimiento progresivo (motilidad), para ser considerado apto para su congelación.

- **Concentración espermática**

Para su determinación se utilizó la técnica de "Recuento Directo" (Conejo, 1991); empleando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se introdujo al semen una micropipeta con capacidad de 1ml (1000 µl), el cual se depositó a una dilución formada (1:1000), 10 µl de semen y 990 µl de agua destilada en un ependor (2 ml.) y someterlo al vortex. Posteriormente, se tomó de la muestra diluida con una micropipeta y se llenó la cámara de Neubauer por gravedad, en seguida se observó al microscopio con el objetivo 40X para realizar su conteo de las dos áreas. Cada área está formada por 25 cuadros, subdivididos a su vez en 16 cuadros más pequeños.

Un vez que fue localizado el área de observación, se realizó el conteo, considerándose únicamente los espermatozoides presentes en los 5 cuadros grandes del rayado; los 4 de la esquina y 1 del centro. Los espermatozoides

que toquen las líneas superiores e izquierda de un cuadro se incluyeron en la cuenta de ese cuadro, y se excluyeron los que se encontraron atravesados en las líneas derecha e inferior; el mismo procedimiento de conteo se realizó para la segunda área. Se utilizó un contador manual para esta operación.

Para determinar la concentración espermática, al número total de espermatozoides contados en estos 5 Cuadrantes se le multiplica por el factor de cámara (50), por el factor de dilución (100), y por un factor de conversión (1000), siendo el resultado espermatozoides/ml.

Así, si contamos en los 5 Cuadrantes: $13 + 14 + 15 + 12 + 10 = 64$ espermatozoides. La concentración espermática es: $64 \times 50 \times 100 \times 1000 = 320\,000\,000$ espermatozoides/ml.

- **Espermatozoides vivos**

Se determinó mediante la técnica de tinción, para esto primero se homogeniza la muestra luego tomamos 10 μ l de semen y 10 μ l de colorante eosina al 5% en solución salina y se colocan en un extremo de una lámina portaobjetos. Se hace un frote y se deja secar por un momento con el propósito de colorear a los espermatozoides. El frote se observa con el objetivo de 100X, se realiza el conteo en 10 campos tanto como espermatozoides vivos y muertos (García, 2000).

Conejo et al., (1990) y Poto et al., (2000), señalan que cuando se realiza el examen de espermatozoides vivos y muertos, un eyaculado de buena calidad no debe presentar menor de 80% de células vivas.

Los espermatozoides vivos y muertos se diferenciaron por su forma de reaccionar a estos colorantes; los espermatozoides inmóviles, aparentemente muertos se tiñeron de color rosado por el colorante debido a que su membrana plasmática se hace permeable a este, mientras que los móviles no presentaron tinción ya que su membrana plasmática actuó a modo de barrera impidiendo el paso del colorante (Caicedo Y Pérez, 1992).

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muerto se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Vivos \%} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Total de células}} \times 100$$

$$\text{Muertos \%} = \frac{\text{Células muertas}}{\text{Total de células}} \times 100$$

c. Preparación de los dilutores para criopreservación

Para el proceso de congelación de semen, se emplearon dos diluyentes que fueron diferentes en su composición.

1. Diluyente BTS (Beltsville Thawing Solution)

Se preparó la solución BTS (Beltsville Thawing Solution) como dilutor de congelación que contiene 3.7 gr de glucosa, 0.125 gr de EDTA, 0.6 gr de citrato de sodio, 0.125 gr de bicarbonato de sodio y 0.075 gr de cloruro de potasio, diluidos en agua destilada estéril (Pursel y Jonson, 1975). A la solución base, se le adicionó 0.3 % ml de yema de huevo y se le centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos para eliminar los sólidos (grumos). La solución clarificada se separó en una primera fracción denominada solución A, y en una segunda fracción denominada solución B, a la que se le adicionó 0.7% de glicerol.

Cuadro 1. Composición química del dilutor BTS (Beltsville Thawing Solution) empleado para la criopreservación del semen de verraco.

BTS (Beltsville Thawing Solution)	
Componente	
Glucosa (g)	3.7
EDTA* (g)	0.125
Citrato de sodio (g)	0.6
Bicarbonato de Sodio (g)	0.125
Cloruro de Potasio (g)	0.075
Yema de Huevo (ml)	3
Gentamicina (ul)	50

Agua Destilada (ml)	50
Glicerol (ml)	7
Total (ml)	100

*EDTA (Ácido Etilen Diamino Tetra Acético)

2. Diluyente Tris – Glucosa - Yema de Huevo

Se preparó el dilutor Tris-Glucosa-Yema huevo como dilutor de congelación que contiene 3.63 gr de Tris, 0.5 gr de glucosa, 1.95 gr de ácido cítrico, 15 ml de yema de huevo y se le centrifugó a 2000 rpm por 10 min para eliminar los sólidos (grumos) La solución clarificada se separó en una primera fracción, denominada solución A, y en una segunda fracción denominada solución B, a la que se le adicionó 5 ml de glicerol.

Cuadro 2. Composición química del dilutor Tris-Glucosa - yema huevo empleado para la criopreservación del semen de verraco

Tris-Glucosa-Yema Huevo	
Componente	
Tris (g)	3.63
Glucosa (g)	0.5
Ácido cítrico (g)	1.95
Yema de Huevo (ml)	15
Penicilina (UI)	100000
Estreptomicina (mg)	100
Agua Destilada (ml)	80
Glicerol (ml)	5
Total (ml)	100

d. Dilución de semen

Para proceder a la dilución con el dilutor es preciso eliminar total o parcialmente el plasma seminal. Para ello se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos y después se elimina el sobrenadante, y se recupera la porción espermática libre de plasma del fondo del tubo (pellets) lo cual se diluirá con la solución A, llevar por 15 minutos a la refrigeradora. Pasado los 15 minutos añadir la solución B y llevar nuevamente al refrigerador por espacio de 2 horas (tiempo de equilibrio).

e. Congelación de semen

El semen se congeló usando el método de congelación en pajillas.

- Verter el nitrógeno líquido hasta 3 cm de altura dentro de una caja de tecnopor de 25 x 15 x 15 cm. (largo x ancho x alto, respectivamente).
- Colocar en su interior una gradilla o rejilla metálica de 7 cm de alto (esto es para que la superficie del nitrógeno líquido esté a 7 cm donde se colocarán las pajillas cargadas). Cerrar la caja de tecnopor.
- Pasado las 2 horas sacar la muestra (pellets + solución A + B) del refrigerador, mover el tubo cerrado para homogenizar la muestra, y cargar las pajillas de 0.25 ml.
- Sellarias con alcohol polivinílico por su extremo abierto y sumergir en agua completamente para que el alcohol polivinílico se solidifique y forme un tapón.
- Retirar el exceso de alcohol polivinílico que pudiera quedar fuera de la pajilla.
- Abrir la caja de tecnopor y colocar las pajillas sobre la rejilla metálica luego cerrar la caja de tecnopor y dejar 10 minutos para que el vapor de nitrógeno líquido las enfrien.
- Transcurridos 10 minutos, lanzar las pajillas al nitrógeno líquido para su congelación completa.
- Retirar las pajillas de la caja y almacenarlas en las canastillas del tanque criogénico.

f. Descongelación

- Colocar un tubo Falcon en el baño maría, y también cerca de allí una tijera y una hoja de papel toalla.
- Retirar la pajilla del nitrógeno líquido, sostenerla firmemente por el extremo del tapón del alcohol polivinílico y sumergirla completamente en el agua del baño maría por 30 segundos.
- Retirarla cumplido el tiempo y sacudirla.

- Con la otra mano, secar inmediatamente la pajilla con la hoja de papel toalla pasando sobre la pajilla sólo una vez.
- Cortar el extremo de la pajilla por un extremo y colocar este extremo dentro del tubo Falcon sin tocarlo.
- Con la ayuda del dedo meñique y anular sostener el otro extremo de la pajilla y cortar este otro extremo, el contenido caerá dentro del tubo, luego evaluar la motilidad masal y espermatozoides vivos.

3.9 ANÁLISIS DE ESTADISTICO

Para la presente investigación se evaluaron 2 tratamientos: T0 = Testigo = semen fresco, T1 = TRIS, T2= BTS y 20 repeticiones por cada tratamiento, haciendo un total de 60 datos. Los datos promedios obtenidos en porcentajes fueron transformados al arco seno. Para el análisis estadístico de los datos se utilizara el diseño de bloques completamente al azar D.B.C.A.

El modelo estadístico empleado para el análisis de varianza es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Corresponde a las variables de motilidad espermática y espermatozoides vivos, en el i-ésimo ($i=1$ y 2) verraco; en la j-ésima ($j=1, 2, 3, 4, 5...10$) observación.

μ = es la media general, de la variable expuesta en cualquier observación sin interesar el verraco estudiado.

T_i = es el efecto del i-ésimo dilutor estudiado, donde $i = 1$ y 2 .

B_j = es el efecto del j-ésima es la edad del verraco, donde $j=1$ y 2 .

E_{ijk} = es el error asociado a la j-ésima observación, del i-ésimo verraco.

Se usó los paquetes y software estadísticos, como el SAS PSS versión 9.1 y el programa Excel.

Se aplicó la prueba de Tukey, al nivel de 5% de probabilidad para analizar las diferencias entre las medias de las variables en estudio.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos se muestran por separado para cada una de las variables analizadas en los tratamientos; así mismo se presentan los resultados que se obtuvieron de la evaluación del semen en fresco y al descongelado.

4.1 EVALUACION SEMINAL EN ESTADO FRESCO

El porcentaje de motilidad masal y espermatozoides vivos de los verracos mejorados, varían significativamente ($p < 0,05$). Estas variables microscópicas también son influenciadas por la edad.

Cuadro 3. Se muestran los valores promedios y desviación estándar obtenidos para las variables evaluadas en estado fresco.

VARIABLE	9 MESES Promedio \pm d.e	36 MESES Promedio \pm d.e
MOTILIDAD MASAL (%)	83.40 \pm 3.34	81.05 \pm 4.97
ESPERMATOZOIDES VIVOS (%)	82.10 \pm 2.29	80.35 \pm 2.63

El resultado obtenido para la variable motilidad espermática (Cuadro 3), es ligeramente inferior al que reporto Guzmán, (2003) quien evaluó semen de porcino antes de su criopreservación y obtuvo una media de 85% en semen fresco. Por otra parte, Córdova *et al.*, (2004) realizaron un estudio de criopreservación de semen porcino y obtuvieron una media de 84.76% de motilidad espermática en semen fresco; este resultado es superior a lo obtenido en la presente investigación.

El resultado obtenido para la variable espermatozoides vivos (cuadro 3), es ligeramente inferior con la que reportó Benítez, (2004) quien evaluó la criopreservación de eyaculados y obtuvo una media de 82 % de espermatozoides vivos en semen fresco. Por otra parte los resultados de la presente investigación es superior a lo que reportó Muñoz, (2008) quien realizó un estudio de criopreservación de semen porcino y obtuvo una media de 75.1% de espermatozoides vivos en semen fresco.

El hecho que se haya presentado diferencias entre el porcentaje de motilidad masal y espermatozoides vivos de esta investigación y las mencionadas anteriormente puede deber se a la diferencias de razas entre sementales, así como las edades y condiciones ambientales que prevalecieron en distintas investigaciones.

4.2 EVALUACION SEMINAL POST CONGELAMIENTO

4.2.1 MOTILIDAD MASAL

Los porcentaje obtenidos de la variable motilidad masal, varían significativamente ($p < 0,05$), en cuanto a las edades de los verracos y los dilutores evaluados en investigación como se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Motilidad masal por tipo de diluyente en semen post congelamiento.

DILUTORES	9 MESES Promedio \pm d.e (%)	36 MESES Promedio \pm d.e (%)
BTS ¹	45.15 \pm 1.06 ^a	43.91 \pm 1.03 ^a
TRIS ²	37.95 \pm 1.26 ^b	35.97 \pm 1.27 ^b

^{1,2} Dilutores empleados en los tratamientos.

^{a,b}. Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Como se muestra en el Cuadro 4, se evidencian principalmente que la mejor motilidad masal de los espermatozoides post congelamiento, se obtuvo con el dilutor BTS presentando un 45.15% (9 meses) y 43.91% (36 meses) de motilidad masal, porcentajes que son superiores al dilutor TRIS que se obtuvo 37.95% (9 meses) y 35.97% (36 meses) de motilidad masal.

Al ejecutar el análisis de varianza a los datos mencionados post congelamiento, se pudo determinar que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en su motilidad masal por lo que se demuestra estadísticamente que uno de los tratamientos es diferente al otro.

Mientras tanto los resultados obtenidos de esta investigación (cuadro 4), también son superiores a lo que reportó Carpio, et al., (2008), quien obtuvo una motilidad de semen post congelado de 34.5%, utilizando como dilutor BTS.

Para hacer algunas comparaciones de motilidad con otras especies a los resultados obtenidos hay una serie de investigaciones, como lo efectuado en semen de ovinos, Cabrera et al., (2010) reporta que en ovinos Assaf y Blackbelly, la motilidad del semen descongelado fue de 63.77% y 62.33% respectivamente, utilizando como dilutor Tris.

En caprinos, Tapia, et al., (2001) quienes evaluaron un método de congelación utilizando dilutor TRIS y obtuvieron 49.7% de motilidad masal. Muñoz, (2008) al investigar el efecto del diluyente TRIS en semen de Ciervo (pudú) encontró resultados al post descongelado de 53.4% de motilidad masal.

Del mismo modo Córdova et al., (2004) quienes realizaron un estudio de criopreservación de semen porcino y obtuvieron una media de 47.14% de motilidad espermática post descongelado. Por otra parte estos resultados de la investigación son superiores a los que reportaron Bathgate et al., (2006), quienes analizaron la motilidad en espermatozoides criopreservados de porcinos, reportando un 33% de motilidad espermática.

En el cuadro 4 los resultados muestran que son superiores a los que reportaron Carpio et al., (2008) quienes realizaron un estudio de métodos de congelación en pajillas de 0.5 ml (34.5%) de motilidad masal. Sin embargo, Pursel y Johnson (1975) reportaron una motilidad masal inferior para semen congelado en pajillas (40%).

4.2.2 ESPERMATOZOIDES VIVOS

Para esta variable se encontraron diferencias estadísticas significativas entre dilutores ($p < 0.05$), el mejor resultado presentó el diluyente BTS, encontrándose diferencias entre estos tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Espermatozoides vivos por tipo de diluyente en semen post congelamiento.

DILUTORES	9 MESES Promedio \pm d.e	36 MESES Promedio \pm d.e
BTS ¹	48.65 \pm 0.97 ^a	46.95 \pm 1.71 ^a
TRIS ²	45.10 \pm 0.88 ^b	43.99 \pm 0.89 ^b

^{1,2} Dilutores empleados en los tratamientos.

^{a,b} Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Como se muestra en el Cuadro 5, el mayor porcentaje de espermatozoides vivos de post congelamiento, se obtuvo con el dilutor BTS presentando un 48.65% (9 meses) y 46.95% (36 meses), resultados que son superiores al dilutor TRIS que se obtuvo 45.10% (9 meses) y 43.99% (36 meses) de espermatozoides vivos.

Al ejecutar el análisis de varianza a los datos mencionados post congelamiento, se pudo determinar que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en espermatozoides vivos por lo que se demuestra estadísticamente que uno de los tratamientos es diferente al otro.

Los resultados obtenidos de esta investigación (cuadro 5) son superiores a los que reportó Carpio, *et al.*, (2008) al evaluar la respuesta de criopreservación obtuvo espermatozoides vivos en semen congelado de 40.7%, utilizando como dilutor BTS. En otro estudio Guthrie y Welch (2005) reportan estos mismos resultados al congelar semen de verraco con dilutor BTS de 44.2% espermatozoides vivos.

Para hacer algunas comparaciones de espermatozoides vivos con otras especies a los resultados obtenidos hay una serie de investigaciones, como lo

efectuado en semen de ovinos, Sandoval et al., 2007 obtuvieron valores post-descongelamiento con dilutor Tris un porcentaje de 63.12%.de espermatozoides vivos

En caprinos, Tapia et al (2001) quienes evaluaron un método de congelación utilizando dilutor Tris y obtuvieron 55.3% de espermatozoides vivos

Muñoz, (2008) al investigar el efecto del diluyente TRIS en semen de Ciervo (pudú) encontró resultados al post descongelado de 47,1% de espermatozoides vivos.

Los resultados obtenidos son superiores al obtenido por Benitez, (2004), quien preservó semen de cerdo de distintas razas con la técnica de Westendorf modificada y el porcentaje más alto de espermatozoides vivos lo obtuvo en cerdos Pelon Mexicano, con una media de 31.2 %; por otro parte los valores obtenidos en esta investigación para esta variable son similares a los de Waterhouse et al., (2006) ya que al evaluar la tolerancia a la congelación de semen de cerdo de diferentes razas, observaron que después de la descongelación los porcentajes de espermatozoides vivos se redujeron significativamente ($p < 0.05$) 48.9% y 45.6%.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y en función a los objetivos planteados, se concluye lo siguiente:

1. Se demostró que existe efecto sobre la criopreservación de semen de verraco con los dilutores empleados.
2. Los mejores resultados para la variable motilidad masal post descongelamiento, se obtuvo con el dilutor BTS presentando un 45.15% (9 meses) y 43.91% (36 meses) de motilidad masal, porcentajes que son superiores al dilutor TRIS que se obtuvo 37.95% (9 meses) y 35.97% (36 meses) de motilidad masal.
3. De acuerdo a los resultados para la variable espermatozoides vivos post descongelamiento, se obtuvo con el dilutor BTS presentando un 48.65% (9 meses) y 46.95% (36 meses) de espermatozoides vivos, porcentajes que son superiores al dilutor TRIS que se obtuvo 45.10% (9 meses) y 43.99% (36 meses) de espermatozoides vivos.
4. Con respecto a los resultados obtenidos en la investigación indicaron que hubo mejor motilidad masal y espermatozoides vivos post descongelamiento, con el dilutor BTS en comparación con el TRIS.

RECOMENDACIONES

- En base a las conclusiones obtenidas en el presente estudio para criopreservar semen de verraco de diferentes edades se recomienda utilizar el dilutor BTS, con que se obtuvo mejores resultados de motilidad masal y espermatozoides vivos.
- Se recomienda realizar más estudios sobre dilutores en la criopreservación de semen de verracos mejorados, en una población mayor para así poder tener mejores resultados.
- Para obtener una muestra de calidad para la criopreservación se recomienda tener en cuenta los materiales estériles, el tiempo que dura entre la obtención de la muestra y el traslado al laboratorio, y como mínimo 80% de motilidad masal y espermatozoides vivos.
- Inseminar con semen congelado.
- Como investigación secuencial a la presente, se debe ejecutar pruebas espermáticas post descongelamiento para determinar la condición de la membrana celular como la integridad del acrosoma, pruebas hipoosmóticas entre otros y finalmente la fertilidad de estas células.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.L, Swine, 1999. In *Reproduction In Farm Animals*, De E.F.E. Hafez, 5ta edition, Lca. Febiger, Philadelphia.
- BATHGATE, R., MAXWELL, W.M.C., and Evans G. 2006. Studies on the Efect of Supplementing Boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro on post-thaw sperm. Quality. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 68 -73.
- BENITEZ, M.J.A. 2004. Comparación de la calidad del semen criopreservados con la técnica de Westendorf modificada en cerdos criollos y comerciales. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit.
- BERRIOS R. 1981. Congelamiento del semen porcino. Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. p. 12-16.
- BOIXO, J.C, 1994. Valoración Laboratorial de la Calidad Seminal: Correlación con fertilidad. 7mas Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Holanda.
- BRACKETT, G.B., SEIDEL, G.E. y SEIDEL, M.S. 1988. Avances en zootecnia. Nuevas técnicas en reproducción animal. Ed. Acribia. España pp 143 – 181.
- CABRERA V. P, AYULO L. A, PANTOJA A. C, 2011. Efecto del dilutor Tris y Citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima.
- CABRERA V. P, ORELLANA, CH. J, PANTOJA A. C. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima.
- CABRERA. V. P., AYULO. L. A, Pantoja A.C. 2011. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima. *Rev Inv Vet Perú* 2011; 22 (2): 105-113.

CAICEDO y PEREZ, 1992. Sincronización de Celo e Inseminación Artificial en Cerdas, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

CALDERON, O, 1998. Primer curso de Inseminación Artificial y Reproducción del Ganado Porcino, Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente.

CAMACHO, D y MOREJON, 2000. Edison, Valoración de la Calidad de Semen Porcino Utilizando el Test de Endósmosis y Test de Resistencia Osmótica, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

CARPIO C. M, CADILLO C. J y MELLISHO S.E. 2008. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima. Rev Inv Vet Perú 2008; 19 (1): 15-19.

CARPIO C.M, CADILLO C.J, MELLISHO S.E, 2008. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima.

CASTELLANOS, J, 1992. Semen Porcino, Producción, conservación y resultados, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, España.

COLE, H & CUPPS, P, 1998. Reproducción de los animales domésticos, Traducido del francés por Dr. José Gómez Piquei. 8va edición, Suibia, España.

CONEJO N. J.J., LOPEZ, Z. V. M., CARO,S.S., ORTEGA, G.R. y CACHO, V.P. 1990 Fertilidad y tamaño de la camada en cerdas inseminadas vs. cerdas servidas con monta natural. Memorias del XXV congreso nacional de AMVEC Pto Vallarta, Jalisco, México.

CÓRDOVA, I.A., MUÑOZ M.R., CÓRDOVA J.S., CÓRDOVA J.A., PÉREZ G.J. 2004. Características del semen de verraco y su evaluación práctica. Disponible en <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.-php?tema=iar021>

CORDOVA, I.A., PELAEZ, L., DOMINGUEZ, J.C., PEÑA, F.J. y ALEGRE, B. 2000. Uso de semen congelado en la inseminación artificial del ganado porcino. Departamento de Producción Agrícola y Animal. México, D. F. 320 - 322.

- CORDOVA, I.A., PEREZ, G.J. y MARTIN, R.S. 2004. Fases previas y postcongelacion del semen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides. *Universidad y Ciencia*. 20: (40): 61-68.
- CORREA, J.R., RODRÍGUEZ, M.C., PATTERSON, D.J. y ZAVOS, P.M. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*. 46, 413-420.
- CUNNINGHAM, J, 1997. *Fisiología Veterinaria*, 2da edición, Philadelphia, USA, Interamericana-McGraw-Hill.
- DECUADRO, G. 2001. Avances en inseminación artificial porcina. Disponible en: <http://www.acontece.com.ar>
- DECUADRO-HANSEN, G. 2001. Los beneficios de la inseminación artificial. *Acontecer porcino (MX)* 9(46): 21-23.
- DORADO M. J. M. 2002. Respuesta a la congelación descongelación del esperma de macho cabrío. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba.
- FISER, P. S., AINSWORTH, y LANGFORD, G. A. 1981. Effect of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of spermatzoa. *Cryobiology*, 18: 339-403.
- GADEA, J. 2003. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro. Disponible en <http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle&artid=213>
- GARCIA, P, 1994. El Test de Resistencia Osmótica en Porcinos, I.N.I.A, Área de reproducción animal, España, Séptimas jornadas Internacionales de Reproducción Animal.
- GARCIA, R.J.A., PUENTE, S., CORCUERA, D., SAGUES, A., y MARTIN, R.S. 1998. Evaluación practica del semen. Importancia de los resultados de fertilidad. V simposium internacional de reproducción e inseminación artificial en porcinos. Memorias. León, Gto. México. Pg. 27 – 36.
- GONZÁLEZ, C. 2002. Influencia de la calidad seminal. Disponible en <http://www.degesa.com/b8.htm>

- GORDON, I. 1997. Reproducción controlada del cerdo. Trad. Antonio Callén Mora. Zaragoza, Es., Acribia. 267 p.
- GUTHRIE H. D, WELCH G. R, 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63: 396-410
- GUZMAN, A.L.E, 2003. Evaluación de una técnica para la crioconservación del semen de porcino. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit.
- HAFEZ, E.S.E, 1993. Reproducción e Inseminación Artificial en animales, 6ta edición,
- HAFEZ, E.S.E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6 Ed. México, Mc- Graw-Hill-Interamericana. 543 p.
- HERMANN, H.A, 1994. The Artificial Inseminations and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle, 8th edition, Interstate Publishers, Illinois,.
- HUGHES, P. E.; VARLEY, M. A. 1984. Reproducción del cerdo. Trad. Mariano Illera Martin. Zaragoza, Es. 253 p.
- HUNTER, R. 1987. Reproducción de los animales de granja. Trad. Pedro Ducar Malvenda. Zaragoza, Es. Acribia. 200p.
- JARA, A. 2000. Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile, tercer curso Internacional sobre producción animal, Universitaria, Chile.
- KUBUS, S. A., 1993. Manual de Inseminación Artificial Porcina, Equipo técnico de Kubus, Madrid, España.
- LE COZ, P. 2005. Inseminación Artificial, La página del cerdo. Disponible en: www.3tres3.com/inseminacion_artificial/index.php?id_ficha=37&PHPSESSID=602e46eea83941fb0056330e0ae0a4f
- MACHATY, Z., TAKACS, T. and GATHY, I. 1992. Fertilizing capacity of boar semen diluted with belltsville (BTS) and Modified Kev (MK) extenders in relation to storage time and number of spermatozoa per insemination dose. *Animal Reproduction Science*, 29, 289-295.
- MAQUEDA, L. 2001. Conservación de la calidad del semen: diluyentes, empaque, temperatura y transporte. Disponible en <http://www.engormix.com/nuevo/prueba/areadeporcicultura1.asp?valor=113>
- MARTINEZ, R. 2006. Diplomado en Producción Porcina, Módulo en Reproducción

- Porcina, Profesor del Departamento de Producción Animal: 103 Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- MATA H. M. I. 2002. Comparación de dos diluyentes Beltsville Thaiwang solution (BTS) y Taiwan Modificado (TM) utilizados en la conservación de semen porcino para IA y sus costos. Compostela, Nayarit.
- MERCK, 1993. El manual merck de veterinaria, 4ta edición, Centrum Moyam, Cuba. México, Interamericana-McGraw-Hill.
- MINITUBE, 1999. Spermnotes, Volumen III, Issue 2, summer.
- MINITUBE, 2006. Spermnotes, Volumen XI, Issue 4, summer.
- MORENO G. D. F. 2000. Comparación de 3 Diferentes Catéteres en Inseminación Artificial en Porcinos, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- MUÑOZ, T.S.B. 2008. Congelación de semen de pudu efecto de los diluyentes TRIS y LECHE SB sobre semen diluido. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile.
- NAVARRETE, M.R, 1990. Comparación de 5 tipos de diluyentes para la conservación de semen de porcinos a temperatura ambiente en refrigeración a 15°C a las 0, 24, 48 y 72 horas. Tesis de licenciatura. Esc. De Med. Vet y Zoot. UAN. Compostela, Nayarit.
- PEINADO, B., POTO, A., GADEA J. y RUÍZ S. 1998. Estudios preliminares en la crioconservación de espermatozoides porcinos de raza chato murciano. Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Departamento de Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia. España. Vol.47 Pp. 305-310.
- PEREZ, F, 1990. Reproducción Animal, Inseminación Artificial y Trasplante de embriones. 1era edición, España, Científico médica.
- PEREZ, M, 1991. Conferencias sobre producción espermática, Curso de Reproducción Porcina, I.N.I.A, España.
- POLGE, C., SALAMON, S. y WILMUT, I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. Veterinary Record, 87, pp.424-28.
- POTO, A., PEINADO, B., BARBA, C. y DELGADO, J.V. 1999. Congelación de semen de

- porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. Archivos de Zootecnia, 49, pp.493-6.
- PURSEL V. G, y JOHNSON L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J AnimSci 40: 99-102.
- RAGUE, P. 1999. Estudio de la pareja estéril, Servicio de Medicina de la Reproducción, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Dexeus, Barcelona, Disponible en: www.schering.com
- RILLO, M. 1994. Curso Superior de Reproducción Animal, Centro Internacional de altos estudios agronómicos mediterráneos, España.
- RIVERA DEL ALAMO M. M. 2002. Efecto del fotoperiodo sobre la calidad seminal de verracos destinados a inseminación artificial. Facultad de Veterinaria. Universidad: Autónoma de Barcelona. Escuela de Doctorado y de Formación Continuada. España.
- RIVERA V. R. E., 1997. Evaluación de 3 diluyentes en semen porcino para uso a 96 y 129 horas posteriores a la colecta, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- ROCA, J., CARVAJAL, G., LUCAS, X., VASQUEZ, J.M., AND ARSENIO, E.M. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine isemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoo. theriogenology. 60: 77 – 87.
- RODRIGUEZ y MARTINEZ. 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. Disponible en: www.ivis.org
- SAEZ, R.A. 1988. La reproducción de la cerda. Ministerio de educación superior. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la habana. Departamento de reproducción animal. Fac de med. Vet.
- SALAMON, S. y MAXWELL, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination: review. Animal reproduction science, 37: 185-249.
- SANDOVAL M. R; SANTIANI A. A; RUIZ G. L; LEYVA V. V; CORONADO S. L. y DELGADO C. A. 2007. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y

- cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *rev inv vet. Perú*; 18 (2): 107-114.
- SINGLETON, W. L. 1997. Control points an IA program. I curso internacional de reproducción porcina. Memorias. México, D.F. 52 – 57.
- SINGLETON, W. L. 2000. Guía básica para la recolección del semen porcino: evaluación y procesamiento. Disponible en <http://www.acampo.com.ar/espanol/porcinos/porcinos7.htm>
- SORENSEN, A.M, 1991. Reproducción Animal, principios y prácticas, México, Interamericana-McGraw-Hill.
- TAPIA, A; HERRERA, J; SERRANO, M. A; VAZQUEZ, I; SANCHEZ, B; y FISCHER, P. 2001. Efecto de un método de congelación espermática sobre los resultados de viabilidad de los espermatozoides de caprino. Madrid. (España).
- THILMANT, P. 1997. Congelation du sperme de verrat en paillette de 0.5 ml. Resultats sur le terrain. *Ann. Med. Vet.* 141:457 - 462.
- VELIZ P. y GONZÁLEZ, L.A. 2003. Manual de Inseminación Artificial en Porcinos. Instituto de Biotecnología en Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 11 p.
- WABERSKI, D., MEDING, S., DIRKSEN, G., WEITZE, K., LEIDING, C., and HAHN, R., 1994. Fertility of long – term- stored boar semen: influence of extender (androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Animal Reproduction Science* 36. 145-151.
- WATERHOUSE, K.E., HOFMO, P.O., TVERDAL, A. y MILLER, R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Soc. Rep. and Fert.* 131: 887 – 894.
- WESTENDORF P., RICHTER L., TREU H. 1975. Deep freezing of boar semen: laboratory findings and insemination results with the Hülsenberger Pailleten technique. *Deut Tierarztl Woch* 82: 261-300.

ANEXOS

Cuadro N° 6. Datos de la variable motilidad espermática transformados de Porcentaje a Arco Seno.

SEMEN FRESCO		BTS		TRIS	
9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES
80	70	46	44.5	38	37
85	80	44.5	44.6	37.5	37.5
90	75.5	46	42.5	35.5	37.5
80	85	45	44.5	39	35.5
80	82	43.5	42.5	40	34
85	85	46.5	45	37.5	35.6
84	80	45	44	38.5	36.5
85	85	45.5	42.5	37	35.6
80	85	43.5	45	37.5	34
85	83	46	44	39	36.5

TRANSFORMACION A ARCO SENO

SEMEN FRESCO		BTS		TRIS	
9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES
1.11	0.99	0.75	0.73	0.66	0.65
1.17	1.11	0.73	0.73	0.66	0.66
1.25	1.05	0.75	0.71	0.64	0.66
1.11	1.17	0.74	0.73	0.67	0.64
1.11	1.13	0.72	0.71	0.68	0.62
1.17	1.17	0.75	0.74	0.66	0.64
1.16	1.11	0.74	0.73	0.67	0.65
1.17	1.17	0.74	0.71	0.65	0.64
1.11	1.17	0.72	0.74	0.66	0.62
1.17	1.15	0.75	0.73	0.67	0.65

Cuadro N° 7. Análisis de varianza para la variable motilidad espermática.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	2.71094833	0.90364944	882.99	<.0001
Error	56	0.05731000	0.00102339		
Total correcto	59	2.76825833			

Cuadro N° 8. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz cuadrada del medio del error y media de la variable motilidad espermática.

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raiz MSE	Media
0.979297	3.804620	0.031991	0.840833

Cuadro N° 9. Análisis de varianza para la variable motilidad espermática (tratamiento y bloque)

Fuente	Grados de libertad	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	2	2.70433333	1.35216667	1321.26	<.0001
Bloque	1	0.00661500	0.00661500	6.46	0.0138

Cuadro N° 10. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable motilidad espermática en tratamientos

Grupos de Tukey	Media	Numero de observaciones	Tratamientos
A	1.13750	20	0
B	0.73250	20	1
C	0.65250	20	2

Cuadro N° 11. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable motilidad espermática en bloques.

Grupos de Tukey	Media	Numero de observaciones	bloque
A	0.851333	30	1
B	0.830333	30	2

Cuadro N° 12. Datos de la variable espermatozoides vivos transformados de porcentaje a arco seno.

SEMEN FRESCO		BTS		TRIS	
9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES
81.5	78	47.5	48.5	45.5	44.5
80.5	80	49	48	45	45
79	79	50	47	44.5	44.5
85	85	50	48.5	46	45
80	79	48.5	45.5	45.5	43
82	80.5	49	47.5	46.5	45
80	80	47	47.5	43.5	43.5
85	78	49	48	45.5	43
85	80	48	46	44.5	43.4
83	84	48.5	43	44.5	43

TRANSFORMACION A ARCO SENO

SEMEN FRESCO		BTS		TRIS	
9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES
1.13	1.08	0.76	0.77	0.74	0.73
1.11	1.11	0.78	0.77	0.74	0.74
1.09	1.09	0.79	0.76	0.73	0.73
1.17	1.17	0.79	0.77	0.75	0.74
1.11	1.09	0.77	0.74	0.74	0.72
1.13	1.11	0.78	0.76	0.75	0.74
1.11	1.11	0.76	0.76	0.72	0.72
1.17	1.08	0.78	0.77	0.74	0.72
1.17	1.11	0.77	0.75	0.73	0.72
1.15	1.16	0.77	0.72	0.73	0.72

Cuadro N° 13. Análisis de varianza para la variable espermatozoides vivos

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1.87293000	0.62431000	1584.59	<.0001
Error	56	0.02206333	0.00039399		
Total correcto	59	1.89499333			

Cuadro N° 14. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz cuadrada del medio del error y media de la variable espermatozoides vivos.

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raiz MSE	Media
0.988357	2.271934	0.019849	0.873667

Cuadro N° 15. Análisis de varianza para la variable espermatozoides vivos (tratamiento y bloque)

Fuente	Grados de libertad	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	2	1.86876333	0.93438167	2371.60	<.0001
Bloque	1	0.00416667	0.00416667	10.58	0.0019

Cuadro N° 16. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable espermatozoides vivos en tratamientos

Grupos de Tukey	Media	Numero de observaciones	Tratamientos
A	1.122500	20	0
B	0.766000	20	1
C	0.732500	20	2

Cuadro N° 17. Comparación de medias a través de la prueba de Tukey para la variable espermatozoides vivos en bloques.

Grupos de Tukey	Media	Numero de observaciones	bloque
A	0.882000	30	1
B	0.865333	30	2

Cuadro N° 18. Datos de motilidad espermática y espermatozoides vivos en estado fresco transformado a Arco Seno.

MOTILIDAD		ESPERMATOZOIDES VIVOS	
9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES
1.11	0.99	1.13	1.08
1.17	1.11	1.11	1.11
1.25	1.05	1.09	1.09
1.11	1.17	1.17	1.17
1.11	1.13	1.11	1.09
1.17	1.17	1.13	1.11
1.16	1.11	1.11	1.11
1.17	1.17	1.17	1.08
1.11	1.17	1.17	1.11
1.17	1.15	1.15	1.16

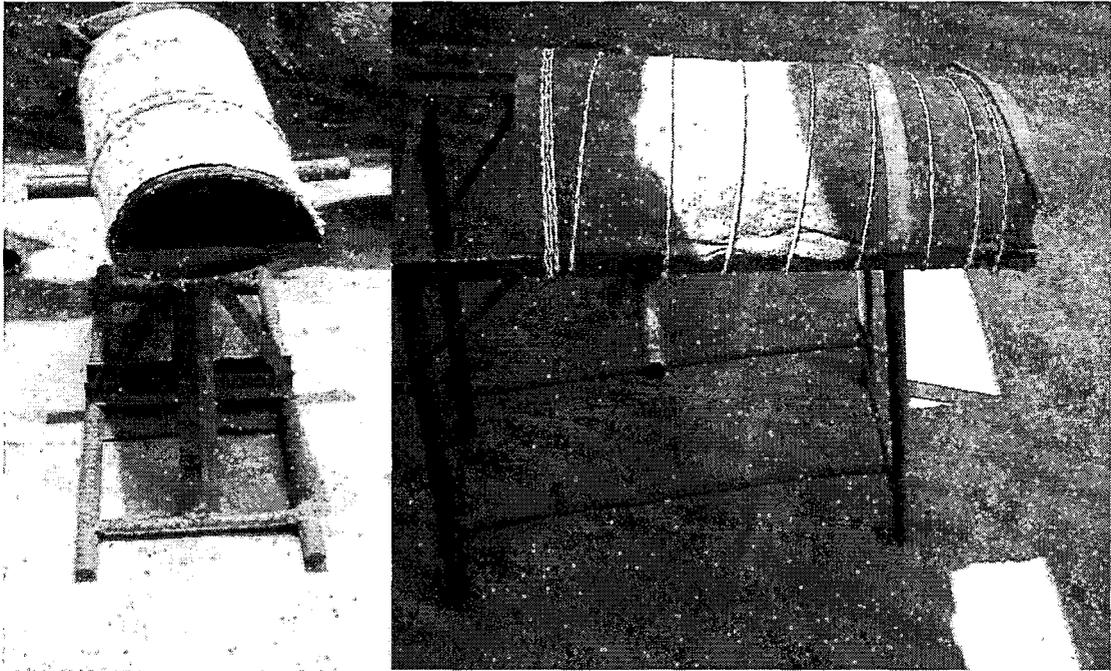
Cuadro N° 19. Datos de motilidad espermática post congelamiento transformados a Arco Seno.

BTS		TRIS	
9 MESES	36 MESES	9 MESES	36 MESES
0.75	0.73	0.66	0.65
0.73	0.73	0.66	0.66
0.75	0.71	0.64	0.66
0.74	0.73	0.67	0.64
0.72	0.71	0.68	0.62
0.75	0.74	0.66	0.64
0.74	0.73	0.67	0.65
0.74	0.71	0.65	0.64
0.72	0.74	0.66	0.62
0.75	0.73	0.67	0.65

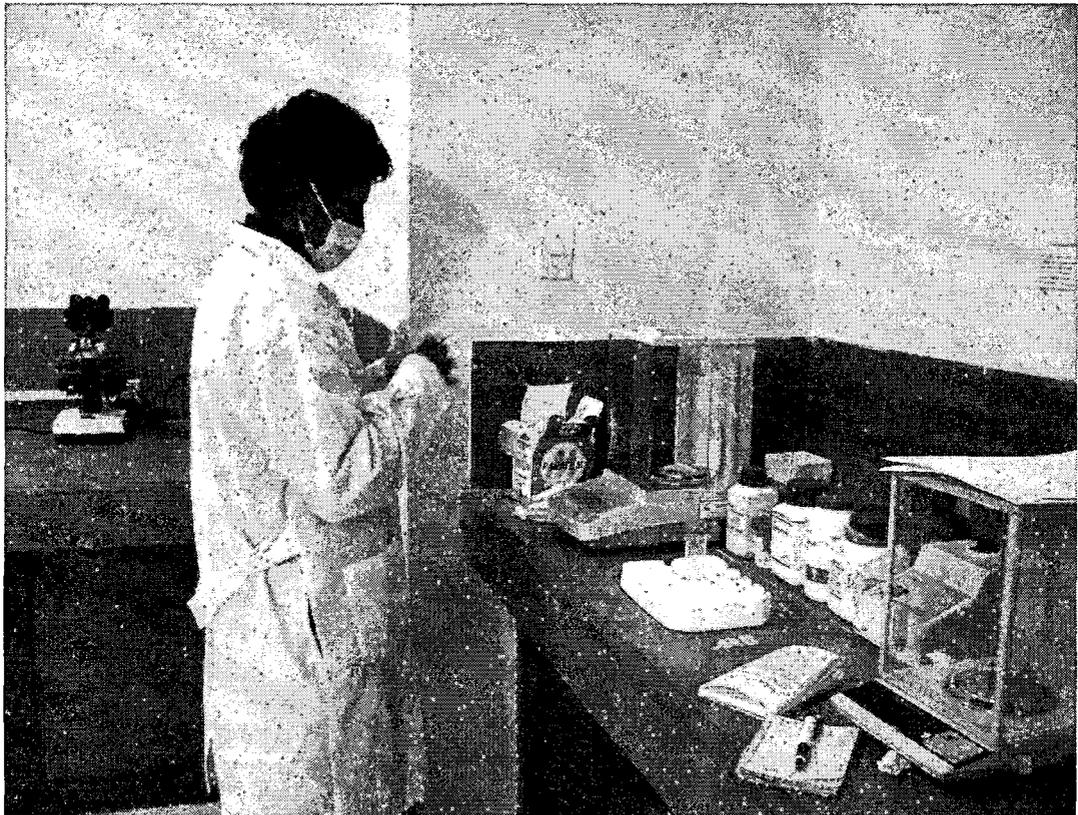
Cuadro N° 20. Datos de espermatozoides vivos post congelamiento transformados a Arco Seno.

BTS		TRIS	
9 MESES	2.5 AÑOS	9 MESES	2.5 AÑOS
0.76	0.77	0.74	0.73
0.78	0.77	0.74	0.74
0.79	0.76	0.73	0.73
0.79	0.77	0.75	0.74
0.77	0.74	0.74	0.72
0.78	0.76	0.75	0.74
0.76	0.76	0.72	0.72
0.78	0.77	0.74	0.72
0.77	0.75	0.73	0.72
0.77	0.72	0.73	0.72

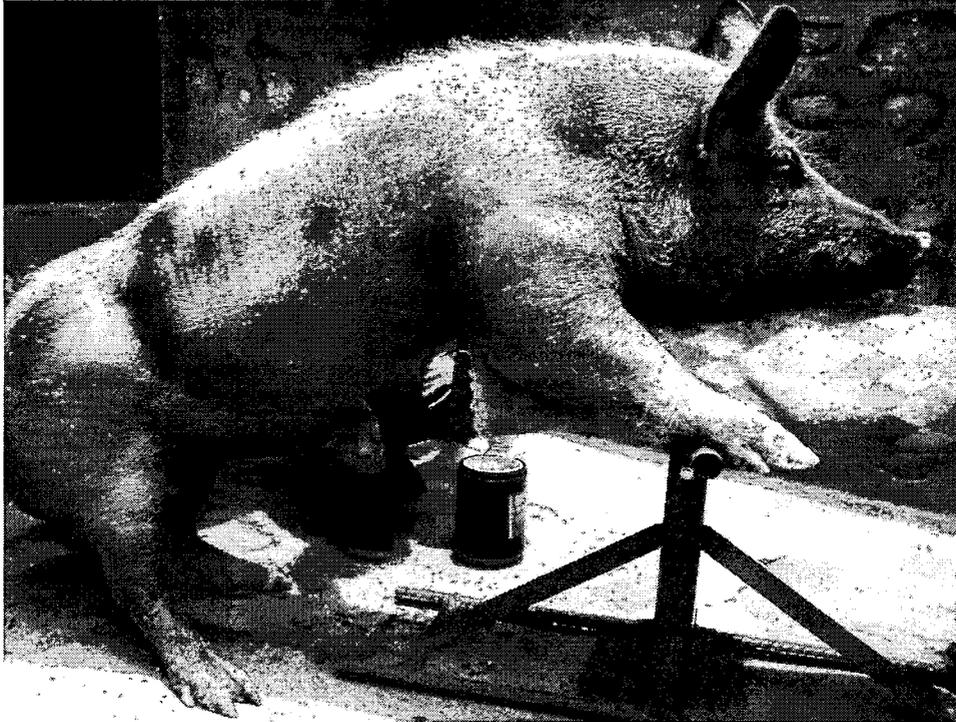
FOTOGRAFIAS



Potro o Maniqui



Materiales y Equipos



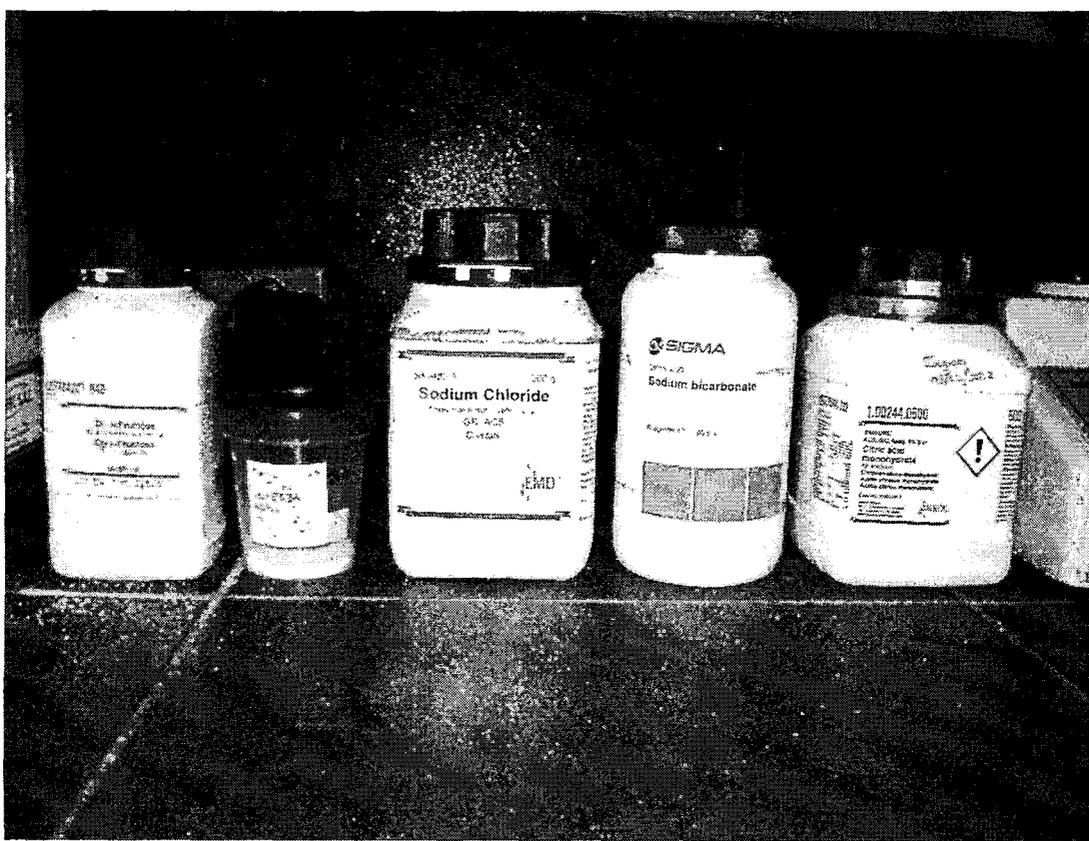
Proceso de colección de semen



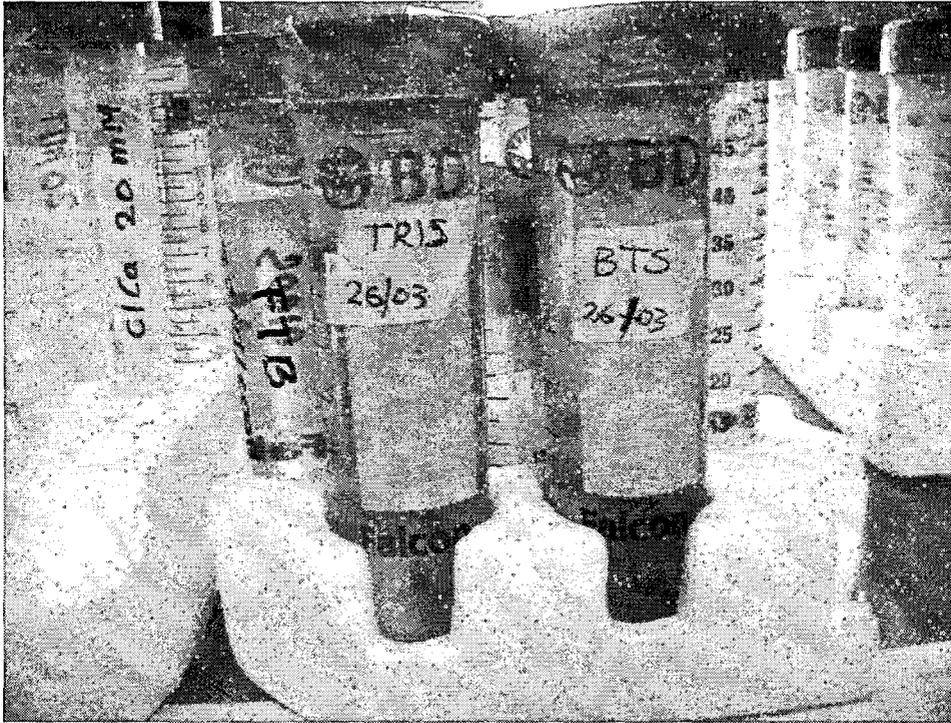
Colección de semen



Muestra de semen



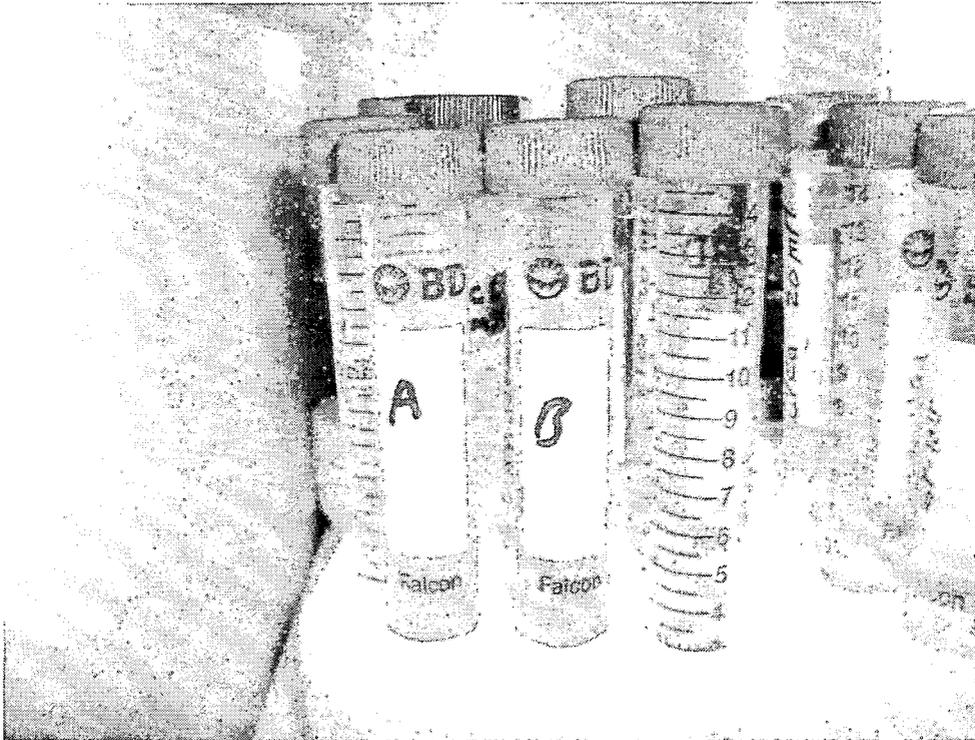
Componentes del dilutor



Dilutor preparado listo para utilizar



Centrifugado del semen



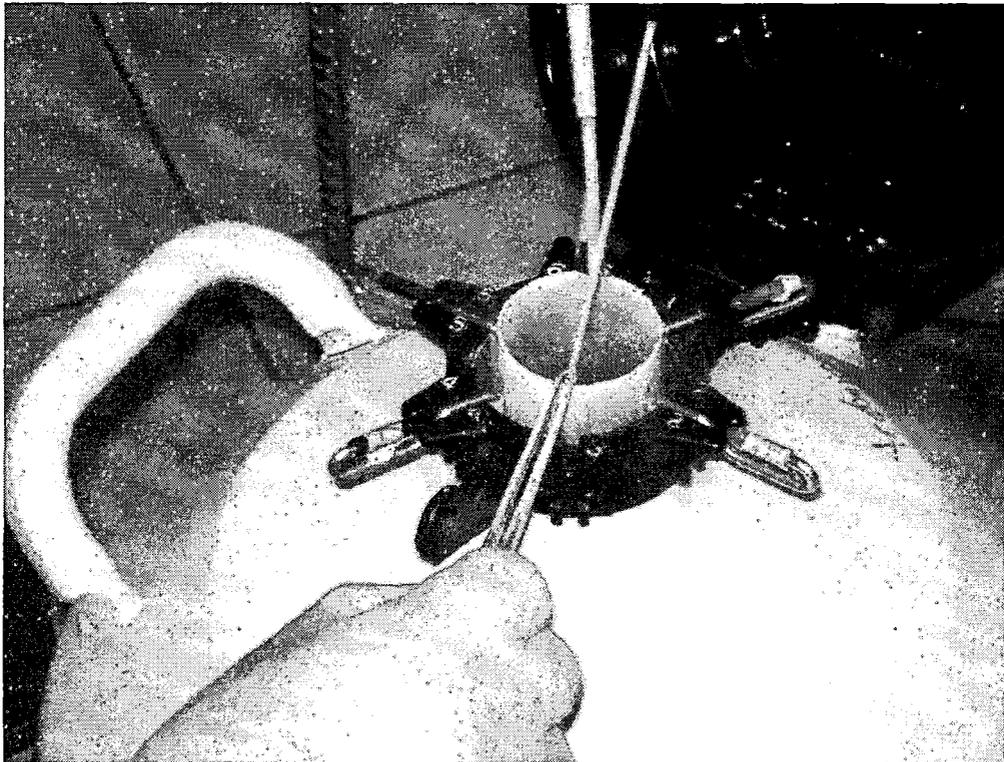
Muestra de semen – dilutor sometidos a refrigeración



Sellado de las pajillas con alcohol polivinilico



Congelación de las pajillas



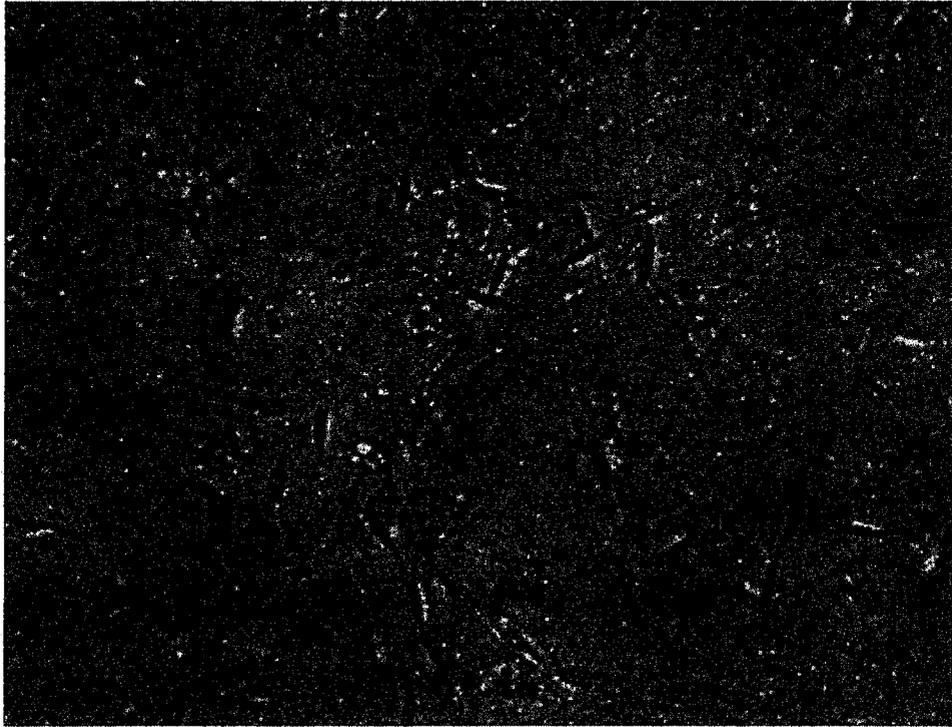
Depositando las pajillas en la canastilla del tanque criogénico



Descongelación de Pajillas



Evaluación de motilidad y espermatozoides vivos al descongelado



Observación de los espermatozoides al microscopio

