

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE “MEDICINA VETERINARIA”**



**“UTILIZACIÓN DE AGUA DE COCO (*Cocos nucifera*)
COMO EXTENSOR DE SEMEN FRESCO DE VERRACOS”**

SARAH LETICIA MARCKWORDT PAREDES

Médica Veterinaria

GUATEMALA, AGOSTO DE 2012

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE “MEDICINA VETERINARIA”**



**“UTILIZACIÓN DE AGUA DE COCO (*Cocos nucifera*) COMO
EXTENSOR DE SEMEN FRESCO DE VERRACOS”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

SARAH LETICIA MARCKWORDT PAREDES

Al Conferírsele el título profesional de

Médica Veterinaria

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, AGOSTO DE 2012

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

“UTILIZACIÓN DE AGUA DE COCO (*Cocos nucifera*) COMO EXTENSOR DE SEMEN FRESCO DE VERRACOS”

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICA VETERINARIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO:	M.V. Leónidas Ávila Palma
SECRETARIO:	M.V. Marco Vinicio García Urbina
VOCAL I:	Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M.V. MSc Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Mercedes de los Ángeles Marroquín Godoy
VOCAL V:	Br. Jean Paul Rivera Bustamante

ASESORES

M.V. MA Ligia Anaité González Quiñonez

M.V. MA Yeri Edgardo Véliz Porras

M. V. Gustavo Enrique Taracena Gil

DEDICATORIAS

A DIOS: por las bendiciones que me has dado y por darme fuerzas para seguir adelante.

A MIS PADRES: Otto y Silvia por darme el ejemplo para llegar a este punto.

A MIS HIJOS: José, Andrea y Natalia para que no pierdan de vista las metas que se propongan, perseveren para cumplirlas y por haber creído en mí.

A MIS HERMANOS: Marlene y Otto. Vicky, Ito, Chío, Paco y Erick, los quiero mucho.

A MIS TÍOS: especialmente a tía Chita, tía Maide y tío Jaime, por el apoyo que me brindaron.

A MIS AMIGOS: especialmente a Marta, Pancho, Mynor, Elliot, Luis, Ronald, Karina, Miriam, Roberto y Oswaldo.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES: por su apoyo, enseñanzas y paciencia en la realización de esta investigación.

A LA ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA: por los conocimientos adquiridos en esta casa de estudios.

AL PERSONAL DE LA GRANJA PINARES: especialmente a Gonzalo Elel que colaboró con la realización de la presente tesis.

ÍNDICE

	No. PAG.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS.....	2
III. OBJETIVOS.....	3
3.1 General.....	3
3.2 Específico.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 El coco.....	4
4.1.1 Taxonomía.....	4
4.1.2 Requerimientos edafoclimáticos.....	5
4.2 El agua de coco.....	6
4.2.1 Contenido nutricional.....	6
4.3 Inseminación artificial.....	7
4.3.1 Historia.....	7
4.3.2 Ventajas de la inseminación artificial.....	8
4.3.3 Desventajas de la inseminación artificial.....	9
4.3.4 Tipos de inseminación artificial.....	9
4.3.5 Material para inseminación artificial.....	9
4.3.6 Técnicas de inseminación artificial.....	10
4.4 Selección de verracos para inseminación artificial.....	11
4.4.1 Entrenamiento del verraco.....	11
4.4.2 Extracción y recolección de semen.....	12
4.4.3 Lugar de extracción.....	13
4.4.4 Potro o maniquí.....	13
4.4.5 Recolección de semen.....	13
4.4.5.1 Materiales.....	13

4.4.5.2	Fracciones del eyaculado.....	14
4.5	Evaluación del semen.....	16
4.5.1	Características macroscópicas.....	16
4.5.2	Características microscópicas.....	16
4.5.2.1	Aglutinación.....	17
4.5.2.2	Movilidad.....	17
4.6	Morfología del espermatozoide.....	18
4.6.1	Coloraciones.....	18
4.6.2	Anormalidades morfológicas.....	20
4.6.3	Evaluación del acrosoma.....	21
4.6.4	Concentración.....	21
4.6.5	Cámara de Neubauer.....	21
4.6.6	Espermiodensímetro de Karras.....	22
4.7	Diluyentes seminales.....	24
4.7.1	Funciones del diluyente.....	25
4.7.2	Clasificación de los diluyentes.....	26
4.7.4	Preparación del diluyente.....	29
4.7.5	Dilución del semen.....	29
4.8	Almacenamiento y conservación del semen.....	29
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1	Localización.....	31
5.2	Material biológico.....	31
5.3	Materiales de campo.....	31
5.4	Materiales de laboratorio.....	31
5.5	Metodología.....	32
5.5.1	Colecta de semen.....	32
5.5.2	Transporte al laboratorio.....	32
5.5.3	Evaluación de la calidad del semen fresco.....	33

5.5.3.1	Análisis macroscópico.....	33
5.5.3.2	Análisis microscópico.....	33
5.5.4	Dilución del eyaculado.....	35
5.5.5	Preparación del diluyente.....	35
5.5.6	Preparación de las dosis seminales.....	35
5.5.7	Conservación de las diluciones.....	36
5.5.8	Unidad experimental.....	37
5.6	Análisis estadístico.....	37
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
VII.	CONCLUSIONES.....	41
VIII.	RECOMENDACIONES.....	42
IX.	RESUMEN.....	43
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	45
XI.	ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y GRÁFICAS

CUADROS	No. PAG.
1. Contenido nutricional del agua de coco para 100 ml.....	7
2. Composición del semen de verraco.....	15
3. Tipo de componente, función y sustancias más frecuentemente empleadas en la formulación de diluyentes para semen porcino.....	26
4. Composición en g/l de los diluyentes de inseminación artificial porcina más utilizados.....	28
5. Evaluación macroscópica y microscópica del semen nativo.....	39
TABLAS	
1. Evaluación de espermatozoides durante la primera prueba a diferentes hora post-dilución	50
2. Evaluación de espermatozoides durante la segunda prueba a diferentes horas post-dilución.....	51
3. Porcentaje de motilidad de espermatozoides a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	52
4. Porcentaje de espermatozoides vivos a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	53
5. Porcentaje de espermatozoides muertos a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	54
6. Número de aglutinaciones de espermatozoides a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	55

	No. PAG.
7. Anormalidades de espermatozoides a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	56

GRÁFICAS

1. Porcentaje de motilidad de espermatozoides a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	57
2. Porcentaje de espermatozoides vivos a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	58
3. Porcentaje de espermatozoides muertos a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	59
4. Número de aglutinaciones a diferentes horas de evaluación post-dilución.....	60

I. INTRODUCCIÓN

Entre las estrategias utilizadas para aumentar la productividad de los animales, se incluye la creación de líneas de animales genéticamente superiores con un gran potencial productivo y reproductivo.

El plasma seminal por sí solo, no permite el mantenimiento de una conservación duradera del semen, debido a esto se debe añadir un medio adecuado (diluyente), el cual debe conservar la vida media y el poder fecundante de los espermatozoides, mantener la integridad de las estructuras celulares y proveer la energía necesaria para el metabolismo de las mismas.

La elección del diluyente debe ir asociada al tipo de uso que se vaya a hacer del mismo.

Cuando el tiempo de conservación es inferior a tres días, la elección es un diluyente de corta duración y con resultados equivalentes a los diluyentes de larga duración. Cuando lo que se pretende es conservar dosis seminales por más de cuatro días, se utilizan diluyentes de larga duración y se aumenta la concentración de la dosis para compensar las pérdidas por envejecimiento de los espermatozoides.

En cualquier caso, la elección del diluyente debe realizarse para optimizar los resultados de la fertilidad y prolificidad en las condiciones particulares de cada explotación porcina, ya que es crucial su repercusión en el rendimiento económico de la explotación.

En este estudio, se evaluó la capacidad del agua de coco para preservar el semen fresco de cerdos, ya que es un producto natural que conjuga azúcares y antioxidantes en una misma solución.

II. HIPÓTESIS

El agua de coco como extensor de semen no afecta sus propiedades respecto al porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, presencia de aglutinaciones, anormalidades y movimiento individual.

III. OBJETIVOS

3.1 General

- Contribuir al estudio de extensores de semen en porcinos.

3.2 Específico

- Evaluar el efecto del agua de coco sobre la viabilidad espermática (tiempo de duración, porcentaje de vivos y muertos, aglutinaciones, motilidad y formas anormales).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 El coco

4.1.1 Taxonomía

Pertenece a la familia *Arecaceae*

Nombre científico: *Cocos nucifera*

Nombre común: Palma de coco.

Probablemente sea nativo de las islas del Pacífico y hoy en día cultivado en todos los trópicos. Es una palmera monoica de tronco único, con frecuencia inclinado, de 10-20 metros de altura y de 50 centímetros de grosor en la base y estrechándose hacia la parte superior. En el ápice presenta un grupo de hojas que protegen el único punto de crecimiento o yema terminal que posee la planta.

El crecimiento en altura depende de las condiciones ecológicas, de la edad de la planta y del tipo de cocotero.

Las hojas son pinnadas, de 1.5 a 4 metros de longitud, con folíolos coriáceos de 50 a 70 centímetros de longitud, de color verde amarillento. La copa no es muy amplia y se compone de hasta 30 hojas arqueadas.

Posee inflorescencias paniculadas que nacen en las axilas de las hojas inferiores, protegidas por una bráctea llamada “espata” de hasta 70 centímetros de longitud y se desarrolla en 3 ó 4 meses. La época de floración es de noviembre a marzo y los frutos tardan en madurar hasta 13 meses.

Puede ser anemófila o entomófila. En los cocoteros gigantes las flores masculinas se abren antes de que las femeninas estén receptivas, lo cual

contribuye a la polinización cruzada. En el caso de los cocoteros enanos es simultánea, por lo tanto, hay un porcentaje alto de auto-fecundación.

El fruto es una drupa cubierta de fibras, de 20 a 30 centímetros de longitud con forma ovoide, pudiendo llegar a pesar hasta 2.5 kilogramos. Está formado por una cáscara externa amarillenta, correosa y fibrosa (exocarpo) de 4 ó 5 centímetros de espesor, con forma de pelos fuertemente adheridos a la nuez, una capa intermedia fina (mesocarpo) y otra más dura (endocarpo) que dispone de tres orificios próximos en disposición triangular, situado en el ápice, dos cerrados y el otro frente a la raicilla del embrión.

La pulpa blanca es comestible, conteniendo en su cavidad central un líquido azucarado conocido como “agua de coco” y que en cantidad aproximada de 300 mililitros se encuentra encerrada en el interior del fruto.

El sistema radicular es fasciculado. Los cocos frescos de la planta se entierran hasta la mitad con las cáscaras en un suelo húmedo. Si se mantiene una humedad constante, éstos comienzan a brotar en dos o tres meses, siendo su crecimiento bastante lento al principio y hasta después de la maduración de la palma.

Debido a sus fuertes espinas desde la germinación, los animales no se alimentan de las plántulas. (8)

4.1.2. Requerimientos edafoclimáticos

La temperatura media diaria debe estar en torno a los 27⁰ C con variaciones de 7⁰ C a 5⁰ C. Los climas cálidos y húmedos son los más favorables para el cultivo de la palma de coco. Una humedad relativa menor del 60% es perjudicial para el cocotero.

El régimen de precipitación anual media es de 1500 mm., con una precipitación mensual mayor de 130 mm. Por tratarse de una planta heliófita, no admite sombra. Para su cultivo, se considera ideal una insolación de 2,000 horas anuales con un mínimo de 120 horas mensuales.

Los suelos aptos para el cultivo del cocotero son suelos con texturas livianas (de francos a arenosos), aluviales, profundos (más de un metro), con una capa freática superficial de 1 a 2 metros de profundidad. Los suelos de la planicie costera son los que presentan estas características.

Debido a su gran demanda de cloro, la existencia de agua salina es hasta beneficiosa, por eso es uno de los pocos cultivos que puede verse en las playas o en sus cercanías. Es muy sensible a las heladas por tratarse de una planta tropical. El rango óptimo de elevación en que se desarrolla el cocotero está entre los 0 a 400 metros. (8)

4.2 El agua de coco

Es el líquido que se encuentra en el interior de la pulpa, cuanto menos maduro esté el fruto será más abundante y también más rico en nutrientes. Se considera un líquido isotónico natural, y se encuentra en una cantidad aproximada de 300 ml, no contiene grasa y con bajo contenido de energía alimentaria (16.7 calorías o 70 kilojulios por cada 100 ml).

CUADRO 1.

CONTENIDO NUTRICIONAL DEL AGUA DE COCO PARA 100 ML.

COMPONENTE NUTRICIONAL	CONTENIDO
Agua (%)	95.5
Nitrógeno (%)	0.05
Energía (kcal)	20
Proteínas (g)	0.1
Carbohidratos (g)	5.5
Lípidos (gr)	0.05
Sodio (mg)	25
Potasio (mg)	160
Cloro (mg)	20
Calcio (g)	5
Fósforo (mg)	0.4
Magnesio (mg)	0.45
	Mg/100 g
Hierro	0.5
Total de sólidos	4.71
Azúcares Reductores	0.80
Total azúcares	2.08
Ceniza	0.62

(7,8)

4.3 Inseminación artificial

4.3.1 Historia

Los primeros trabajos de inseminación artificial en cerdos, fueron realizados en la Unión Soviética, a partir de las experiencias llevadas a cabo por Ivanow en los primeros años del siglo XX (Ivanow, 1907 y 1922), posteriormente se desarrolló su uso en la década de los años 30 en las

granjas estatales rusas (Rodin y Lipatov, 1935; Milovanow, 1938) y en los años siguientes se fue extendiendo a otros países como USA por Mckenzie en 1931 y en Japón por Ito et.al., en 1948. (18)

Luego Lipatov, Rodin y Camisarov realizaron una serie de trabajos que llevaron a la introducción del maniquí para la recolección de semen, descubriéndose posteriormente la vagina artificial, esta última fue establecida como método de recolección del semen por Bonadonna en 1938.

Cuando se resolvió el problema de la recolección de semen, quedaba por descubrir técnicas de dilución y conservación del mismo, las que se desarrollaron a partir de 1950 implementándose equipos técnicos y diluyentes en países como Japón, Inglaterra, Francia y Noruega.(23)

Esta técnica fue introducida en el sector porcino en el Reino Unido gracias a los trabajos desarrollados por Chris Poge (1956), ya que la gran ventaja que aportaba esta tecnología era el aprovechamiento del potencial genético de los mejores verracos en un amplio número de reproductoras, facilitando la mejora genética.

El verdadero desarrollo y la amplia aplicación a nivel comercial de la inseminación artificial porcina se produce a partir de la década de 1980, cuando se estandarizan los protocolos de inseminación.

Durante la evolución de la inseminación artificial, desde su inicio hasta la actualidad, se han desarrollado sistemas de obtención y preparación de dosis, así como, se han mejorado todos los protocolos de inseminación en condiciones comerciales. (18,23)

4.3.2 Ventajas de la inseminación artificial

- Reduce las pérdidas de tiempo.

- Mejora el material genético.
- Reduce el número de verracos en las instalaciones (ahorro en espacio, comida y operarios)
- Permite realizar programas de cruzamientos.
- Reduce la diseminación de enfermedades reproductivas.
- Permite la realización de pruebas de progenie en los verracos.
- Evita la consanguinidad. (23)

4.3.3 Desventajas de la inseminación artificial

- Requiere de un nivel de manejo más alto que en monta natural.
- Errores humanos frecuentes.
- El semen recolectado está más expuesto a cambios ambientales.
- Fallas en la detección del celo.
- Contaminación del equipo a usar. (21)

4.3.4 Tipos de inseminación artificial

Durante el servicio natural, el verraco eyacula cuando el glande en forma de espiral se encuentra encerrado dentro del cérvix de la cerda, la presión de este encierro estimula la eyaculación.

El método preferido para recolectar el semen del verraco es el de fijación, el cual consiste en sostener el glande con la mano a medida que sale del prepucio. Se aplica una presión continua para estimular la eyaculación, lo cual puede durar de 10 a 20 minutos. La eyaculación se interrumpe si no se mantiene la presión. (2)

4.3.5 Material para inseminación artificial

- Catéter de inseminación doblado en un ángulo de 30⁰ dos centímetros antes del final, y una espiroqueta, lo cual simula el pene del verraco.

- Toalla de papel para limpiar la vulva.
- Botella plástica flexible que se utiliza para introducir el semen a través del catéter hacia la cervix de la cerda. (2)

4.3.6 Técnicas de inseminación artificial

Es conveniente evaluar la calidad del semen con un microscopio antes de usarlo, ya que el transporte, dilución, temperatura de almacenamiento, fluctuaciones de temperatura y tiempo transcurrido desde la colecta pueden afectar su vida útil, motilidad y viabilidad.

Se debe usar una toalla de papel para limpiar la vulva antes de proceder a la inseminación.

Se lubrica el extremo de la pipeta o del catéter con algún lubricante que no sea espermicida, debe cuidarse de no obstruir el orificio del instrumento con el lubricante. (16)

Luego se introduce el catéter de inseminación en la vagina a través de los labios de la vulva y se dirige hacia arriba y hacia adelante en la dirección de la configuración espiral del cervix.

Una vez en contacto con el cervix, el catéter se gira en el sentido contrario a las agujas del reloj para quedar fijado en el mismo, si la punta está sujeta al cervix, se sentirá resistencia cuando se rota el catéter.

Se sujeta el recipiente de semen al catéter y se presiona con suavidad durante varios minutos (3 a 5 minutos) para que el semen llegue al útero. (12)

Se debe mantener cierta presión en la región dorsal con la rodilla para que la cerda se mantenga estimulada.

Cuando la botella se ha vaciado, se retira el catéter, dejando una pequeña cantidad de semen en su interior para evitar la penetración de aire.

(23)

4.4 Selección de verracos para inseminación artificial

Cuando se seleccionan a los verracos se consideran las siguientes características:

- Tasa de crecimiento.
- Tasa de conversión alimenticia.
- Medida del espesor de la grasa dorsal.
- Calidad de los aplomos.
- Que no sean portadores de características genéticas indeseables como: atresia anal, hernias inguinales y umbilicales o libido reducido.

(23)

4.4.1 Entrenamiento del verraco

Los verracos seleccionados, son entrenados para montar maniqués, extraer el semen y estudiar su conducta sexual.

Los machos se empiezan a entrenar a partir de los 8 ó 9 meses de edad, con una frecuencia de dos veces por semana.

Para asegurar un entrenamiento exitoso es muy importante mantener una actitud tranquila con el animal y evitar siempre que el animal se asuste, por lo que se recomienda que el entrenamiento y la extracción sean realizados por una persona con experiencia.

Preferiblemente, se traslada a los animales a la zona de extracción y se les muestra el maniquí, observando su actitud y nunca forzándoles a subir;

cuando suban, lo que es habitual en animales jóvenes y nerviosos, se realizará una primera extracción. Una vez iniciada la rutina de extracción, durante este período de adaptación, se realizará una extracción semanal para asegurar el desarrollo adecuado de los testículos. (2)

Si después de 10-15 minutos el animal no muestra interés en subir, es conveniente retirar el maniquí y volver a insistir al día siguiente. En estos casos, se puede intentar iniciar el entrenamiento en su corral y, una vez suban al maniquí, realizar las extracciones en la sala empleada para tal fin.

Para estimular a los animales jóvenes y aumentar su libido, se puede utilizar el maniquí después de un macho adulto, rociar el maniquí con una dosis de semen o bien colocar a los verracos nuevos cerca de la sala de extracciones. (2)

En ocasiones algunos machos que muestran temor y estrés, no suben al maniquí por las siguientes causas:

- Presencia de verracos adultos en la misma zona: para solucionar el problema, conviene separar a los jóvenes de los adultos.
- Suelo resbaladizo.
- Patas débiles o cojeras. (2)

4.4.2 Extracción y recolección de semen

El método más utilizado es el de fijación, el cual consiste en mantener presión firme a nivel del glande, usando un maniquí, ya que éste sugiere que la inmovilidad, en todas sus formas, es el principal criterio por el que el verraco reconoce a la hembra receptiva. (4)

Antes de realizar la extracción de semen, el verraco debe estar con un buen grado de excitación, el cual depende de la raza y de la edad.

El contenido en el saco prepucial debe ser eliminado antes de proceder a la extracción del semen, ya que este líquido tiene un efecto dañino en los espermatozoides. (23)

4.4.3 Lugar de extracción

Debe ser limpio y amplio para que le permita al verraco la libre circulación alrededor del potro o maniquí.

Es recomendable que el suelo no sea liso para evitar que el verraco resbale durante el proceso y que no sea muy áspero para evitar daños en las patas. (21)

4.4.4 Potro o maniquí

Las medidas recomendadas para el potro o maniquí son: 50 cm. de alto x 90 cm. de largo x 30 cm. de ancho, el cual debe estar firme sobre el suelo para que resista el peso del verraco y debe estar impregnado con secreciones, como orina de una hembra en celo, saliva y semen de otro verraco para estimularlo sexualmente. (21)

4.4.5 Recolección de semen

4.4.5.1 Materiales

La higiene del equipo es muy importante en todo el proceso de colecta, en la actualidad se usan materiales desechables lo que evita contaminaciones que puedan alterar la viabilidad de los espermatozoides.

El material a usar es el siguiente:

1. Guantes: sin talcos ni productos químicos que puedan tener efecto espermicida.

2. Recipiente para recolección: puede usarse un recipiente plástico o de vidrio, graduado y esterilizado.
3. Gasa o filtro de papel: para filtrar el eyaculado durante la recolección y evitar la aglutinación de los espermatozoides. (18)

4.4.5.2 Fracciones del eyaculado

La duración de la eyaculación en el cerdo oscila entre 4 y 7 minutos y se compone de tres fracciones, las cuales se diferencian durante el proceso, estas son:

1. Fracción prostática: líquido transparente con pocos espermatozoides.
2. Fracción espermática: contiene de 500,000 a 1,000,00 de espermatozoides/mm³.
3. Fracción post-espermática: líquido claro cuya concentración espermática disminuye hasta 100,000 espermatozoides/ mm³. (23)

CUADRO 2.**COMPOSICIÓN DEL SEMEN DE VERRACO**

CARACTERÍSTICAS	CONCENTRACIÓN
Depresión del punto de congelación °C.	0.62 (.59-0.63)
pH	7.5 (7.3-7.9)
Agua (g/100ml)	95(94-98)
Bióxido de carbono (ml/100ml)	50
Sodio (mg/100ml)	660(290-850)
Potasio (mg/100ml)	260 (90-410)
Calcio (mg/100ml)	2-6
Magnesio (mg/100ml)	11 (5-15)
Cloruros (mg/100ml)	330(150-430)
Fósforo total (mg/100ml)	66
Fósforo soluble en ácido (mg/100ml)	24
Fósforo inorgánico (mg/100ml)	2
Fosfolípidos (mg/100ml)	6
Nitrógeno total (mg/100ml)	615(335-765)
Nitrógeno no proteico (mg/100ml)	22
Amoníaco (mg/100ml)	1
Urea (mg/100ml)	5
Ácido úrico (mg/100ml)	3
Ergotioneina	6-23
Glicerilfosforilcolina	110-240
Fructosa	12(2-5)
Ácido cítrico	140 (30-330)
Ácido láctico	30
Inositol	600-750
Presión osmótica	290-300 mOsm

(10,27)

4.5 Evaluación del semen

Se realiza la evaluación macroscópica y microscópica del semen, considerando normal un eyaculado que presente las siguientes características:

4.5.1 Características macroscópicas

Características	Parámetros normales
Volumen	250 -500 cm ³
Consistencia	Gelatinosa, contiene numerosos copos, de aspecto grumoso, parecidos a una “tapioca” y que proceden de las glándulas de Cooper.
pH	7.5
Olor	Sui generis
Color	Blanco opaco
Motilidad en masa	>85%
Motilidad espermática	50-90%
Aglutinación	1+
Concentración de espermatozoides	2 a 7 X 10 ⁹ espermatozoides por eyaculado
Espermatozoides morfológicamente normales	70-90%
(10, 11,17,29)	

4.5.2 Características microscópicas

Se observan las siguientes características:

4.5.2.1 Aglutinación

No es raro observar, en el examen de esperma fresco de verraco acúmulo de espermatozoides aglutinados, esto puede suceder por distintas causas, tales como: suciedad, oxidación, dilución que actúa sobre las anti-aglutininas de origen prostático, etc. (5)

La aglutinación se clasifica de la siguiente manera:

+	1-5 paquetes	ESCASA AGLUTINACIÓN
++	6-10 paquetes	REGULAR AGLUTINACIÓN
+++	10-15 paquetes	MEDIANA AGLUTINACIÓN
++++	16-20 paquetes	ABUNDANTE AGLUTINACIÓN

4.5.2.2 Movilidad

El examen del esperma sin diluir, debe ser practicado lo más pronto posible después de la colecta, a una temperatura próxima a la corporal, se debe usar una platina precalentada a 37⁰ C para evitar el choque térmico y se extiende una gota de semen sobre un portaobjetos. (2, 5)

Se valora individualmente e indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides.

La evaluación que se hace es cuantitativa, la cual valora el porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100%) y la evaluación cualitativa que evalúa la calidad o vigor en una escala de 0-5, según el tipo de movimiento, que puede ser:

0. Inmóvil (muerto).
1. Girando entre sí, sin movimiento progresivo.
2. Movimiento anormal, en ocasiones progresivo.

3. Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
4. Con movimiento progresivo rápido.
5. Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido.

El semen de buena calidad posee el 70% de motilidad y el tipo de movimiento debe ser no menor a la categoría 4. (4)

4.6 Morfología del espermatozoide

Para observar la morfología de los elementos figurados del espermatozoide, se necesita el recurso de preparaciones coloreadas. Los frotis deben ser delgados y se realizan de la siguiente manera: En el extremo de un porta-objetos se deposita una gota de esperma, se extiende sobre éste en una capa lo más delgada posible, usando para esto un cubre-objetos e inclinado el porta-objetos en un ángulo de 45°. Luego se deja secar al aire libre y se fija después por inmersión en una solución de alcohol metílico o de alcohol rectificado de 90° o en una solución de formalina al 5%.

Es conveniente, para descartar cualquier alteración espermática, evitar todo choque térmico durante el secado de estas extensiones; los eyaculados demasiado concentrados son manejados mucho mejor si se diluyen al 1/10, con lo cual se puede obtener un examen microscópico más rápido. (2,5)

4.6.1 Coloraciones

Se han utilizado distintos medios de coloración, de los cuales, dependiendo el tipo de colorantes se han dividido en dos grupos: coloraciones totales y coloraciones vitales.

- Coloraciones totales:

1. Coloraciones simples:

Azul de Metileno, Azul de Toluidina, Violeta de Genciana y Fuchsina. Éstas proporcionan una coloración uniforme del espermatozoide.

2. Coloraciones dobles:

William, Giemsa y Karras. Éstas hacen aparecer las diferencias estructurales en las distintas partes del zoospermio, como modificaciones en la cabeza, en el acrosoma o en la pieza intermedia.

(5)

Un examen rápido puede hacerse empleando la solución de Rojo de Bengala, con ésta no existe sobre-coloración.

- Coloración con tinta china: Es un método de tinción simple, rápido y recomendable para un trabajo corriente. Es muy fácil y consiste en realizar una extensión lo más fina posible con una gota de espermatozoide mezclada con otra de tinta china, luego se deja secar al aire libre. Es una coloración negativa donde los espermatozoides aparecen en tono claro o sin teñir sobre un fondo gris negruzco.

Esta coloración pone de manifiesto perfectamente la forma de la cabeza y la existencia de la gota protoplásmica, así como los distintos elementos del zoospermio. (5)

- Coloraciones Vitales:

Estas coloraciones sirven para diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos.

1. Solución de Eosina y de Opal-Azul en un medio tamponado de Fosfato isotónico: los espermatozoides muertos aparecen coloreados y los

vivos no se tiñen.

2. Coloración de Eosina-Nigrosina: los espermatozoides muertos toman intensamente el colorante y aparecen teñidos en rojo o en rosa, mientras que los espermatozoides vivos permanecen incoloros.
3. Coloración con Eosina-Nigrosina y Azul de Bromofenol: ponen de manifiesto la gota citoplásmica.

* Las técnicas de tinción más utilizadas son las de Violeta de Metilo y Eosina-Nigrosina y la de Fluorescencia. (5)

4.6.2 Anormalidades morfológicas

Cabeza: puede presentar anomalías de forma, dimensión, duplicación, posición o de estructura del acrosoma y afinidades tintoriales.

Cuello: estas anomalías afectan la implantación de la cabeza, las cabezas sin cola, la persistencia de la gota protoplásmica. Los espermatozoides inmaduros se expulsan llevando la gota protoplásmica, la presencia de 2 a 3% de espermatozoides inmaduros significa la existencia de trastornos en la espermatogénesis.

Pieza intermedia: puede ser más ancha, más o menos ovalada, acortada, doble o mal insertada sobre la cabeza. La presencia de la gota protoplásmica en la extremidad de la pieza intermedia es la causa de un trastorno testicular o epididimario reciente.

También se encuentra en eyaculados frecuentes durante un tiempo corto.

Pieza principal: puede presentar anomalías de longitud, de estructura, de calibre, estar enroscada sobre sí misma o alrededor de la cabeza e incluso presentar una duplicación o triplicación.
(5,21)

4.6.3 Evaluación del acrosoma

Para determinar el estado del acrosoma se fija la muestra en una solución de Glutaraldehído (2%) y se observa en un microscopio con contraste de fases.

Se distingue un borde apical nítido que corresponde con el acrosoma o bien alteraciones del mismo.

El estado del acrosoma también puede ser evaluado mediante el empleo de lectinas como la PNA que junto con el Ioduro de Propidio permite estudiar el proceso de reacción acrosómica. (31)

4.6.4 Concentración

La concentración consiste en el número total de espermatozoides por ml de eyaculado.

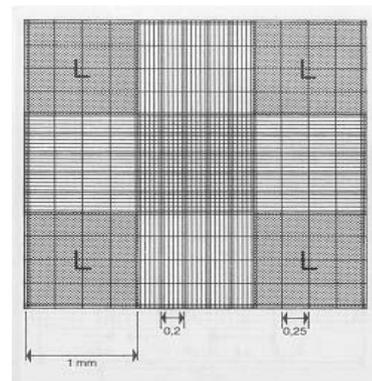
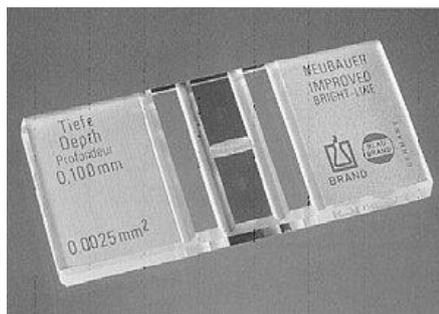
La concentración de espermatozoides varía entre 2 a 7×10^9 ó un promedio de 4.5×10^9 . Este valor tiene gran importancia y es necesario conocerlo para juzgar la calidad de un eyaculado. (10, 29)

Hay disponibles varios instrumentos para estimar el número de células espermáticas como el hemocitómetro, densímetro para semen según karras, espectrofotómetro y SpermaQue. (13)

4.6.5 Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. El área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado.

La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 micro litro. (28, 30)



4.6.6 Espermiodensímetro de Karras



El espermiodensímetro se usa para determinar la densidad del eyaculado de verracos y toros.

La medida se basa en la turbiedad de la suspensión espermática, que se mide en la escala del espermiodensímetro a diferentes concentraciones.

1. Producción de la suspensión:

Colocar 9.0 ml de una solución de NaCl al 0.85% dentro del densímetro. Agregar 1 ml de semen a la solución de NaCl.

Cerrar el instrumento con el dedo pulgar y mover cuidadosamente 2 ó 3 veces, para suspender parejamente los espermatozoides en la solución de NaCl.

Si el eyaculado es muy denso y la escala no se puede leer, es necesario diluir el eyaculado 1:1 con diluyente y empezar la lectura de nuevo.

Es necesario registrar el factor de dilución (Ej.: 0.2/10; 0.3/10) porque se necesita para poder interpretar la tabla de densidades. (25)

2. Leyendo el espermiodensímetro:

Coloque una tira de papel blanco detrás de la escala para facilitar la lectura, sostenga el espermiodensímetro con sus dedos pulgar e índice, para que la escala quede en la parte de adentro de su mano, es recomendable hacer la lectura con buena luz.

Para hacer la lectura, mantenga el densímetro a distancia de un brazo y a nivel de los ojos. Primero se determinan las marcas enteras (60, 70, 80, etc.) que todavía se reconocen como un número, si la lectura se hace correctamente, la marca anterior debe verse borrosa y las marcas mas bajas deben leerse claramente.

Determinar si la marca anterior del número medio (65,75,85, etc) es legible, si se lee esa marca, va a representar la lectura, si no se lee la marca correcta, sería la del número entero. (25)

3. Leyendo la densidad del eyaculado de la tabla de interpretación:

Basado en la información obtenida del densímetro, la densidad del eyaculado va a ser determinada por la tabla de densidades. La densidad debe recalcularse cuando se usa semen diluido. La densidad del eyaculado corresponde al número que se encuentra en la columna del factor de dilución aplicado, leído en el densímetro.

El número indica la densidad espermática del eyaculado examinado en millones de espermatozoides/ml.

El densímetro debe ser limpiado y secado después de cada medición.
(25)

4.7 Diluyentes seminales

El diluyente es la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, con el objeto de preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado.

Para conservar los espermatozoides durante períodos prolongados, es necesario que reduzca la actividad metabólica de los mismos, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura, pero con un buen poder tamponador para mantener las condiciones de pH y que proporcione los azúcares necesarios para la supervivencia de las células, así como, otros elementos más complejos que permitan asegurar una duración más o menos larga.

La elección del diluyente es muy importante, pero lo principal es obtener un semen de buena calidad, y debe realizarse con el objeto de optimizar los resultados de fertilidad y prolificidad en las condiciones particulares de cada explotación porcina, ya que su repercusión en el rendimiento económico de la explotación es de mucha importancia. (18)

4.7.1 Funciones del diluyente

Para que el diluyente cumpla su función, debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática: Glucosa.

- Protege contra el shock térmico por frío: BSA

- Controla el pH del medio: Bicarbonato de sodio, TRIS, HEPES.
- Mantiene la presión osmótica: Sales NaCl, KCl.
- Inhibe del desarrollo microbiano: Antibióticos.

(10)

CUADRO 3.

TIPO DE COMPONENTE, FUNCIÓN Y SUSTANCIAS MÁS FRECUENTEMENTE EMPLEADAS EN LA FORMULACIÓN DE DILUYENTES PARA SEMEN PORCINO

COMPONENTE	FUNCIÓN	SUSTANCIAS MÁS EMPLEADAS
Nutrientes	Fuente de energía	Glucosa, Galactosa, Ribosa
Agentes tamponadores	Control de pH	Bicarbonato, Citrato Sódico, TES, TRIS, MOPS
Sales	Control de presión osmótica	Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio
Quelantes de calcio	Captura de calcio	EDTA
Antibióticos	Inhibición microbiana	Penicilina, Estreptomicina, Aminoglicósidos

(30)

4.7.2 Clasificación de los diluyentes

Los diluyentes se clasifican según su capacidad de preservar la calidad del semen en el tiempo.

- Corta duración: 1-3 días.
 - Beltsville Liquid (BL-1)
 - Beltsville Thawing Solution (BTS)
 - Illinois Variable Temperatura (IVT)
 - Kiev
- Mediana duración: Conservan el semen de 3-5 días.
 - Kiev

- M III®
- Euro Cocktail (diluyente sin antibiótico y antibiótico por separado). (22)

- Larga duración: Conservan el semen hasta 7 días.
 - Acromax®
 - Androhep®EnduraGuard™
 - Androhep®plus
 - Androstar® plus
 - Modena
 - MULBERRY III®
 - Reading
 - X-Cell®
 - Zorlesco
 - ZORPVA

(18, 25,30)

- Extra-larga duración: Constituyen una nueva generación de diluyentes que pretenden conservar el semen aproximadamente 12-días. Duragen (20)

CUADRO 4.

COMPOSICIÓN EN GRAMOS/LITROS DE LOS DILUYENTES DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA MÁS UTILIZADOS

Composición	IVT	Kiev	BTS	Zorlesco	MRA	ZORPVA	Readin g	Modena	Androhe p
Sustrato Energético									
Glucosa	3	60	37	11.5	+	11.5	11.5	25 ^a	26
Sistema Tampón									
Citrato Sódico	24.3	3.7	6	11.7	+	11.65	11.65	6.9	8
Bicarbonato Sódico	2.4	1.2	1.25	1.25	+	1.75	1.75	1	1.2
EDTA	-	3.7	1.25	2.3	+	2.35	2.35	2.25	2.4
Cloruro de Potasio	0.4	-	0.75	-	-	-	-	-	-
Ácido Cítrico	-	-	-	4.1	-	4.1	4.1	2	-
TRIS buffer (base)	-	-	-	6.5	-	5.5	5.5	5.65	-
HEPES	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Estabilización de la Membrana									
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Cisteína	-	-	-	0.1	+	0.7	0.7	0.05	-
BSA (fracción V)	-	-	-	5	+	-	-	3	2.5
Antibióticos									
Neomicina sulfato	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Penicilina G (Na)	-	0.6	0.6	-	-	-	-	0.6	0.6
Dihidrostreptomina	-	1	1	-	-	-	-	1	1
Ph	-	7.2	7.2	-	6.9	-	-	6.9	6.8
mOsm	290	380	330	240	290	275	300	282	309
MOPS	-	-	-	-	+	-	-	-	-

^aGlucosa Monohidrato/IVT (du Mesnil du Buisson y Dauzier, 1959); Kiev (Plisko, 1965); BTS (Pursel Johson, 1975); Zorlesco (Gottardi et al., 1980); MR-A (Martín Rillo, 1984); ZORPVA (Cheng, 1985); Reading (Revell y Gossop, 1989); Modena (Moretti, 1981); Androhep (Weitze 1990). (18,20)

4.7.4 Preparación del diluyente

Se colocan los recipientes con agua destilada o purificada al baño María a 37° C durante 25 minutos, luego se vierte el diluyente en esta agua, se homogeniza y se espera como mínimo 15 minutos para una buena disolución y estabilización físico-química. Se debe tener cuidado en verificar la temperatura durante todo el proceso.

El momento de la mezcla entre el semen y el diluyente, es de especial sensibilidad, por lo que se debe tener el cuidado de verter lentamente el semen dentro del diluyente.

Es aconsejable que la cantidad de eyaculado a obtenerse para tener una buena concentración de espermatozoides sea de 200 a 250 ml. (19)

4.7.5 Dilución del Semen

Las fórmulas de los diluyentes únicamente funcionan respetando una tasa de dilución mínima, ya que el efecto tampón y el poder protector de la membrana, sólo pueden ejercerse dentro de un cierto rango de dilución el cual, por lo general, es de 1/10 y 1/25, este rango depende del tipo de diluyente a utilizar y de la concentración seminal. Generalmente este rango depende de los diluyentes y es muy importante respetar la dilución, principalmente cuando el período de conservación que deseamos es largo. (19)

4.8 Almacenamiento y conservación del semen

El semen fresco después de diluido y evaluado (evaluación macro y microscópica), se conserva en refrigeración a una temperatura estable entre 15 y 17° C porque disminuye el metabolismo de la célula espermática, lo que

favorece, por más tiempo, la conservación de la viabilidad. No debe haber oscilaciones de temperatura durante la conservación ni durante el transporte.

Se debe dejar un tiempo de adaptación del semen diluido a la temperatura ambiente durante 2 a 3 horas antes de refrigerarlo. Las dosis deben girarse 1 a 2 veces al día para evitar la sedimentación. (17)

Es muy importante que todas las superficies que entren en contacto con el semen se encuentren entre 35°C a 38°C, evitar la exposición directa a los rayos del sol y la contaminación de los materiales utilizados. (17)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

El presente estudio se realizó en la granja Pinares/INAGRO, S.A., ubicada en el departamento de Sacatepéquez, municipio de Sumpango. El municipio tiene una altitud de 1,900 msnm y su extensión superficial es de 55 km², es bosque húmedo subtropical. La latitud norte es de 14⁰, 38', 42"; la longitud este, es de 90⁰, 40', 00"; topografía quebrada, algunas pendientes alcanzan más del 30% de inclinación; temperatura media normal es de 18.2⁰ C. La precipitación pluvial media anual es de 1,265 mm. Humedad relativa del 79%.

5.2 Material biológico

- Verraco semental de raza Dallon, color blanco, de 3 años de edad, peso de 700 libras.

5.3 Materiales de campo

- Potro o maniquí
- Alfombra de hule
- Guantes de hule
- Beaker de 500 ml
- Gasa
- Hielera
- Tape
- Tijeras

5.4 Materiales de laboratorio

- Baño María a 37⁰ C
- Cámara de conservación a 15⁰ C

- Agua destilada
- Pipeta de 0.1 ml
- Botellas plásticas para dilución, de 100 ml de capacidad
- Microscopio de contraste de fases
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Espermiodensímetro de Karras
- Papel indicador de pH
- Probeta de 1,000 ml
- Solución de Cloruro de Sodio al 10%
- Colorante eosina
- Sulfato de Gentamicina
- Agua de coco

5.5 Metodología

5.5.1 Colecta de semen

La colecta del semen se realizó por el método manual, recogiendo únicamente la fracción rica del eyaculado en un termo debidamente atemperado a 37° C y cubierto con una gasa estéril para filtrar las partículas contaminantes y las secreciones de la glándula de Cowper. Se realizó una sola colecta, la cual se utilizó para la evaluación del eyaculado nativo y posteriormente efectuar la dilución con el agua del coco.

5.5.2 Transporte al laboratorio

Luego de colectada la muestra, se llevó inmediatamente al laboratorio para su evaluación.

5.5.3 Evaluación de la calidad del semen fresco

Inmediatamente después de la colecta, se realizaron las evaluaciones

para determinar la calidad del semen nativo y su poder de fecundación. Los análisis que se realizaron fueron los siguientes:

5.5.3.1 Análisis macroscópico

1. Volumen: Se determinó directamente por medio de la graduación del beaker en cc.
2. Color: Se valoró visualmente.
3. pH: Se utilizó papel indicador universal.
4. Olor: Se determinó de acuerdo a una apreciación individual. Olor característico de la especie.

5.5.3.2 Análisis microscópico

5.5.3.2.1 Motilidad individual (%)

Para observar la motilidad, se colocó una gota del eyaculado fresco en un porta objetos atemperado a 37° C, luego se colocó el cubre objetos y se procedió a la evaluación en el microscopio con los objetivos 25x y 40x; previamente, se calentó la platina a 37° C para evitar el choque térmico.

La valoración mínima de motilidad permitida para el semen fresco es de 60 a 70%, con un tipo de movimiento moderado.

5.5.3.2.2 Aglutinaciones (+)

En la misma preparación utilizada para evaluar el movimiento individual (inciso 1), se evaluó el número de aglutinaciones por campo, utilizando los objetivos 25x y 40x.

La aglutinación se clasificó de la siguiente manera: + 1-5 paquetes

++ 6-10 paquetes

+++ 11-15 paquetes

++++ 16-20 paquetes

5.5.3.2.3 Vivos y muertos (%)

Luego de homogenizar la muestra, en un extremo de una lámina portaobjetos se colocó una gota de semen nativo y una gota del colorante eosina, se mezcló, se hizo un frotis y se dejó secar. Posteriormente, se observó al microscopio utilizando los objetivos 25x y 40x.

Los espermatozoides vivos permanecen incoloros (refringentes), mientras que los muertos aparecen teñidos de rosado.

El resultado se expresa en el porcentaje de espermatozoides vivos del total de 200 espermatozoides.

5.5.3.2.4 Anormalidades (%)

En un portaobjetos se puso una gota de semen nativo luego una gota del colorante eosina, se mezcló, se hizo un frotis, se dejó secar y luego se observó al microscopio en objetivo 40x.

El resultado se expresa en el porcentaje de anomalías en un conteo de 100 espermatozoides.

5.5.3.2.5 Concentración

La concentración se obtuvo utilizando el espermiodensímetro de Karras, el cual se basa en la turbidez de una suspensión de diferentes concentraciones de espermatozoides, vistas en la escala del densímetro.

(Ver anexo 4.7.6)

5.5.4 Dilución del eyaculado

En el espermiograma se obtuvo la concentración espermática (esper- matozoides/mm³) por medio del espermiodensímetro de Karras, se elaboró la dilución con el agua de coco y el antibiótico Gentamicina, a una concentra- ción de 5x10⁹ espermatozoides/mm³.

5.5.5 Preparación del diluyente

Se procedió a extraer el agua del coco (diluyente), se coló con gasa estéril para evitar que se contaminara con restos de la cáscara, se agregaron 3 cc de Gentamicina, se mezcló y se reservó dentro del baño María a 37° C.

5.5.6 Preparación de las dosis seminales

Fórmula para la determinación del número de dosis seminales utilizando el espermiodensímetro de Karras:

$$\frac{\text{Concentración (millones de espermatozoides x ml) x volumen (ml) x \% de motilidad}}{\text{Número de espermatozoides x dosis}} = \text{Número de dosis}$$

Utilizando esta fórmula en la primera prueba (primera semana) se obtuvo lo siguiente:

Volumen de eyaculado obtenido: 550 ml

$$\frac{555 \times 550 \times 0.90}{5,000} = 55 \text{ dosis}$$

$$55 \text{ dosis} \times 100 \text{ ml} = 5,500 \text{ ml} -$$
$$\frac{550 \text{ volumen de eyaculado}}{4,950 \text{ ml de agua de coco}}$$

Para obtener la dilución, se procedió a mezclar 550 ml de eyaculado con 4,950 ml de agua de coco + 3 cc de Gentamicina.

- En la segunda prueba (segunda semana) se obtuvo lo siguiente:
Volumen de eyaculado obtenido: 350 ml

$$\frac{555 \times 350 \times 0.90}{5,000} = 35 \text{ dosis}$$

$$35 \text{ dosis} \times 100 \text{ ml} = 3,500 \text{ ml} -$$

<u>350 volumen de eyaculado</u>
3,150 ml de agua de coco

Para obtener la dilución, se procedió a mezclar 350 ml de eyaculado con 3,150 ml de agua de coco + 3 cc de Gentamicina.

De la cantidad total de la dilución obtenida, se utilizaron únicamente 1,000 ml, para ser repartida en 10 botellas plásticas para dilución de 100 ml c/u, (el resto de la dilución preparada fue desechada, por no ser necesaria para los fines del estudio).

Las botellas conteniendo la dilución se dejaron en reposo durante 2 horas, tiempo en el cual los espermatozoides se adaptan a su nuevo medio ambiente. Al finalizar el período de adaptación, se efectuó la primera evaluación (hora 0) de la primera botella. Cada 4 horas se sacó una botella de la cámara temporizadora, se llevo a 37° C en el baño María y se procedió a la evaluación. Este proceso se llevó a cabo hasta que se observó actividad espermática no apta para realizar una inseminación artificial. A la semana siguiente se efectuó el mismo procedimiento.

5.5.7 Conservación de las diluciones

El semen diluido fue almacenado a una temperatura de 17° C en la cámara temporizadora.

5.5.8 Unidad experimental

La unidad experimental fue una botella plástica para dilución de 100 ml de capacidad, la cual contenía el eyaculado de verraco más el diluyente (agua de coco) sobre la cual se realizaron las mediciones.

5.6. Análisis estadístico

- Se analizaron los datos con la prueba de t de student para dos muestras dependientes con una significancia del 0.05.

- Para determinar el efecto del agua de coco sobre los espermatozoides, se tabularon los datos de las variables: presencia de aglutinaciones, presencia de anomalías, movimiento individual, porcentaje de vivos y muertos. Posteriormente se compararon con los parámetros de referencia para su análisis, se realizó estadística descriptiva y diferencia de proporciones. (ver tabla de referencia 4.6.1)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis de la evaluación del semen nativo previo a la dilución

Los resultados obtenidos de la evaluación macroscópica y microscópica del semen nativo son los siguientes:

CUADRO 5.

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL SEMEN NATIVO

MACROSCÓPICO	ESTÁNDAR	PRIMERA PRUEBA	SEGUNDA PRUEBA
Volumen	250 -500 ml	550 ml	350 ml
Consistencia	Lechoso	Lechoso	Lechoso
pH	7.5	8	8
Olor	Sui generis	Sui generis	Sui generis
Color	Blanco opaco	Blanquecino	Blanquecino
Impurezas	Libre	Libre	Libre
Temperatura	36-37° C	37° C	37° C
MICROSCÓPICO			
Vivos/muertos	92%/8%	90%/10%	95 %/10%
Motilidad espermática	50-90%	90%	90%
Aglutinación	+	-	-
Concentración de espermatozoides	2 a 7 x 10 ⁹ espermatozoides/cm ³	5 X 10 ⁹ espermatozoides/cm ³	5 X 10 ⁹ espermatozoides/cm ³
Espermatozoides morfológicamente normales	70-90%	95%	95%

(11,17,18)

Los resultados obtenidos en la calificación del semen nativo, se consideran aptos para ser utilizados con el agua de coco como diluyente y su posterior conservación.

6.2 Análisis de espermatozoides post-dilución

6.2.1 Movimiento individual (%)

El porcentaje de la motilidad en la 1ª semana fue de 72.22% y en la 2ª semana de 65.55%.

En el muestreo de la 1ª semana el porcentaje de movilidad se encuentra dentro del rango estándar entre las 24 y 28 horas.

En la segunda semana a las 24 horas ya había llegado al límite inferior del rango estándar, esto se pudo dar debido a la madurez del agua del coco. (Ver tabla 3, gráfica 1)

Estos resultados se consideran normales, ya que la literatura menciona que el rango aceptable en la motilidad es de 60 a 70%, considerándose un eyaculado apto para la fertilización.

6.2.2 Vivos y muertos (%)

Con respecto a los análisis de los datos obtenidos luego de la evaluación de los espermatozoides vivos, en la primera semana se obtuvo una media de 78.55% y una desviación estándar de ± 14.52 , en la segunda semana se obtuvo una media de 79% con una desviación estándar de ± 18.21 . Se determinó que no hay diferencia estadística en la prueba de t-student para dos muestras dependientes ($P=0.819$).

En cuanto a los análisis de los datos obtenidos luego de la evaluación de los espermatozoides muertos, en la primera semana se obtuvo una media

de 21.11% y una desviación estándar de ± 12.40 ; en la segunda semana se obtuvo una media de 24.88% con una desviación estándar de ± 16.57 . Se determinó que no hay diferencia estadística en la prueba de t-student para dos muestras dependientes ($P=0.187$). (Ver tablas 4 y 5, gráficas 2 y 3)

Al utilizar el agua de coco como extensor, los valores del eyaculado se mantienen dentro de los parámetros normales en las primeras 24 horas. (Ver cuadro 6)

6.2.3 Aglutinaciones (+)

En este análisis, se obtuvo un promedio de dos cruces (++) en la primera semana y en la segunda semana una cruz (+), por lo que se mantuvo en un rango normal. Un semen que presenta dos cruces (++) se considera bueno y es aceptable para ser usado en inseminación artificial. (5,23) (ver tabla 6, gráfica 4)

6.2.4 Anormalidades (%)

Las anormalidades observadas fueron en la primera semana, con presencia de espermatozoides de doble cola a las 8 horas.

A las 28 horas se observaron colas quebradas, estas anormalidades pueden ser debido a características genéticas del verraco. (Ver tabla 7)

VII. CONCLUSIONES

1. El agua de coco puede usarse como extensor, ya que no afectó las propiedades reproductivas del semen fresco porcino en cuanto a porcentajes del movimiento individual, vivos, muertos y anomalías, así como, la presencia de aglutinaciones.
2. El agua de coco no altera las propiedades físicas del espermatozoide al utilizarse como diluyente de semen fresco.
3. Se determinó que al usar el agua de coco como extensor de semen porcino, se conservan las propiedades reproductivas del semen fresco durante un período de 24 horas, ya que pasado este tiempo empieza a perderse la capacidad de fertilización de los espermatozoides, por lo que se considera al agua de coco como un extensor de semen porcino de corta duración.
4. El agua de coco tiene efectos positivos al proteger y nutrir a los espermatozoides y garantiza el potencial de fertilidad de los mismos.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar el agua de coco como extensor de semen fresco porcino por un tiempo no mayor de 24 horas post dilución.
2. Evaluar el agua de coco como extensor de semen en otras especies de producción pecuaria.
3. Medir el porcentaje de concepción en hembras inseminadas con semen fresco diluido en agua de coco.
4. Realizar un estudio para determinar si existen diferencias en las distintas etapas de madurez del fruto del árbol de coco y los cambios enzimáticos del agua contenida en éstos para determinar los efectos de ésta sobre los espermatozoides.

IX. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar el efecto del agua de coco como extensor de semen fresco de porcino sobre los espermatozoides, en cuanto a la motilidad individual, porcentaje de vivos y muertos, anormalidades y formación de aglutinaciones. Previamente se evaluó semen fresco de un verraco adulto.

Se determinó que no hay diferencia estadística ($p>0.05$) en la prueba de t-student para dos muestras dependientes para la primera y segunda semana post dilución con agua de coco de los espermatozoides vivos; para los espermatozoides muertos, se determinó que no hay diferencia estadística ($p>0.05$) en la prueba t-student para dos muestras dependientes, para la primera y segunda semana post dilución con agua de coco. El porcentaje de movimiento individual post-dilución en la 1ª semana fue de 72.22% y en la 2ª semana de 65.55%, mientras que en las aglutinaciones se obtuvo un promedio de dos cruces (++) en la primera semana y en la segunda semana una cruz (+), por lo que se mantuvieron en un rango normal y las anormalidades observadas en la primera semana fueron, presencia de espermatozoides de doble cola a las 8 horas y colas quebradas a las 28 horas.

Por lo tanto, se considera el agua de coco como un extensor de corta duración, ya que los espermatozoides mantienen su capacidad fecundante hasta las 24 horas post-dilución.

SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate sperm motility, live and dead sperm, morphologically abnormal sperm and agglutinations effect, using coconut water as semen extender. Previously an adult boar ejaculate was collected and evaluated.

It was determined that there is no statistical difference ($p>0.05$) in the t-student test for two dependent samples on the first and second week post dilution with coconut water of live sperms; it was determined that there is no statistical difference ($p>0.05$) in the t-student test for two dependent samples on the first and second week post dilution with coconut water of dead sperms. Individual motility post-dilution with coconut water percentage was 72.22% on the first week, and 65.55% on the second week, while agglutinations had an average of two crosses (++) on the first week and one cross (+) on the second week, and abnormalities such as double tail sperms at 8 hours and broken tails sperms at 28 hours post-dilution with coconut water were observed.

Therefore coconut water is considered as a short-term semen extender, as it preserves sperm fertilizing capacity as long as 24 hours.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Aalbers, JG. 1983. Diluyente base (o diluyente de referencia): fórmula BTS (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en www.3tres3.com/inseminación.../index.php?id...37.
2. Adaptación y manejo reproductivo de los sementales. 2009. (en línea). Consultado 9 feb. 2010. Disponible en www.eumedia.es/user/articulo.php?id=1212
3. Bearden, J. 1982. Reproducción animal aplicada. Trad. H. Sumano López. México, El Manual Moderno. 358 p.
4. Control reproductivo del verraco. 2010. (en línea). Consultado 3 mayo. 2010. Disponible en www.cuencarural.com/.../porcinos/control-trproductivo-del-verraco/?...
5. Derivaux, J. 1982. Reproducción de los animales domésticos. 2 ed. Trad. J. Gómez. España, Acribia. 486 p.
6. Diluyentes para semen porcino Duragen. 2000. (en línea). Consultado 10 abr. 2010. Disponible en www.acambiode.com/producto_845415256586_94559496809009011595.html-.
7. Diluyentes para semen porcino. 2008. (en línea). Consultado 3 abr. 2010. Disponible en www.miniube.de/produkte/.../Katalog_Schwein_Verduener_es.pdf.
8. El agua de coco. s.f. (en línea) Consultado 2 nov. 2009. Disponible en http://en.wikipedia.org/wiki/Coconut_water".

9. El cultivo del coco. s.f. (en línea). Consultado 2 nov. 2009. Disponible en www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/coco.htm-35k.
10. Escobar, P. 2000. Inseminación artificial en cerdas (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en www.agrobit.com/Info...artif/GA000001in.htm.
11. Faletti, C. 2007. Inseminación Artificial en Porcinos (en línea). Consultado 20 ene. 2010. Disponible en www.mundoagropecuario.es.tl/Inseminación-Artificial-en-Porcinos.htm.
12. Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial porcina (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en www.ergomix.com/los_diluyentesinseminaciónartificial_s_artículos_281_POR.htm.
13. Gélvez. L. 2010. Métodos para la conservación del semen en granjas y fincas (en línea). Consultado 26 abr. 2010. Disponible en mundopecuario.com/.../metodos_para_conservacion_semen.html –
14. Gestión Veterinaria Porcina. 2000. Transporte de seminales del verraco (en línea). Consultado 12 feb. 2010. Disponible en Gestión Veterinaria Porcina, S.L C/ Calibre,121 C.VILLALBA 28400.
15. Gómez Rincón, C. 2008. Diluyentes de refrigeración para semen porcino (en línea). Consultado 26 abr. 2010. Disponible en dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codig.
16. Gordon, I. 1997. Reproducción controlada del cerdo. Trad. A. Callén. España, Acribia 267 p.
17. Hughes, PE. 1984. Reproducción del cerdo. Trad. M. Illera. España, Acribia. 253 p.

18. Hunter, RHF. 1987. Reproducción de los animales de granja. Trad. P. Ducar. España, Acribia. 200 p.
19. La dilución y la conservación. s.f. Consultado 26 abr. 2010. Disponible en petekias.googlepages.com/9.LADILUCINYLACONSERVACION.doc
20. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. 2003. Consultado 26 abr. 2010. Disponible en <http://albeitar.portalveterinaria.com/busquedas/procesabusqueda.asp>
21. Lloveras, MR. 2005. Inseminación Artificial en cerdos (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en mlloveras@pergamino.inta.gov.ar.
22. Maqueda, L. 2007. Conservación de la calidad del semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte (en línea). Disponible en www.engormix.com/inseminacionartificialtemperatura_semen_forumview112.htm
23. Mazzari, G. 1984. Control de la reproducción e inseminación artificial en cerdos (en línea). Consultado 20 ene. 2010. Disponible en mundopecuario.com/.../metodospara_conservacion_semen.html.
24. Najarro García, JF. 2004. Evaluación del uso de leche descremada fluida U.H.T. como extensor de semen porcino sobre la fertilidad y número de Nacidos totales en cerdas inseminadas. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala GT, USAC/FMVZ. 71p.,
25. Padilla Pérez, M. 2007. Manual de porcicultura (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00111.pdf.
26. Philippe, LC. 2007. La dilución y la conservación (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en petekias.googlepages.com/9.

27. Prera Flores, LA. 2002. Utilización de leche descremada fluida U.H.T de bovino como extensor de semen fresco de verracos. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT, USAC/FMVZ.74p.
28. Reina M. 2003. Cámara de Neubauer (en línea). Consultado 2 abr.2010 Disponible en www.ub.es/biocel/wbc/técnicas/contajecelular.htm
29. Singleton, WL. 2000. Guía básica para la recolección del semen porcino (en línea). Consultado 26 abr. 2010. Disponible en www.acampo.ar/.../porcinos/porcinos7.htm -.
30. Técnica de contaje celular (en línea). Consultado 21 mar. 2010. Disponible en www.ubes/biocel/wbc/images/neubauer.jpg.
31. Universidad de Murcia. s.f. Técnicas de análisis seminal (en línea). Consultado 3 feb. 2010. Disponible en www.um.es/grupo-fisiovet/Im-analisis-seminal.htm.

XI. ANEXOS

TABLA 1.

EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DURANTE LA PRIMERA PRUEBA (PRIMERA SEMANA) A DIFERENTES HORAS POST- DILUCIÓN

HORA	% MOVILIDAD	% VIVOS	% MUERTOS	% ANORMALES	AGLUTINACIONES
1	90	95	3	-	-
4	90	95	15	-	+
8	85	85	20	doble cola	+
12	85	85	21	-	++
16	80	80	21	-	++
20	75	80	17	-	++
24	70	73	19	-	+++
28	50	64	24	cola quebrada	+++
32	25	50	50	-	+++

TABLA 2.

EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DURANTE LA SEGUNDA PRUEBA (SEGUNDA SEMANA) A DIFERENTES HORAS POST-DILUCIÓN

HORA	% MOVILIDAD	% VIVOS	% MUERTOS	% ANORMALES	AGLUTINACIONES
1	90	95	5	-	-
4	85	92	18	-	-
8	85	90	12	-	-
12	80	90	18	-	-
16	70	87	17	-	-
20	70	80	25	-	++
24	50	78	29	-	++
28	40	59	40	-	+++
32	20	40	60	-	+++

TABLA 3.

PORCENTAJE DE MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES A DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN

HORA	PRIMERA PRUEBA (PRIMERA SEMANA)	SEGUNDA PRUEBA (SEGUNDA SEMANA)
	% MOTILIDAD	% MOTILIDAD
1	90	90
4	90	85
8	85	85
12	85	80
16	80	70
20	75	70
24	70	50
28	50	40
32	25	20

TABLA 4.

**PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS A DIFERENTES HORAS
DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN**

HORA	PRIMERA PRUEBA (PRIMERASEMANA)	SEGUNDA PRUEBA (SEGUNDA SEMANA)
	% VIVOS	% VIVOS
1	95	95
4	95	92
8	85	90
12	85	90
16	80	87
20	80	80
24	73	78
28	64	59
32	50	40

TABLA 5.

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS A DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN

HORA	PRIMERA PRUEBA (PRIMERASEMANA)	SEGUNDA PRUEBA (SEGUNDA SEMANA)
	% MUERTOS	% MUERTOS
1	3	5
4	15	18
8	20	12
12	21	18
16	21	17
20	17	25
24	19	29
28	24	40
32	50	60

TABLA 6.

**NUMERO DE AGLUTINACIONES DE ESPERMATOZOIDES A
DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN**

HORA	PRIMERA PRUEBA (PRIMERASEMANA)	SEGUNDA PRUEBA (SEGUNDA SEMANA)
	AGLUTINACIONES	AGLUTINACIONES
1	0	0
4	1	0
8	1	0
12	2	0
16	2	0
20	2	2
24	3	2
28	3	3
32	3	3

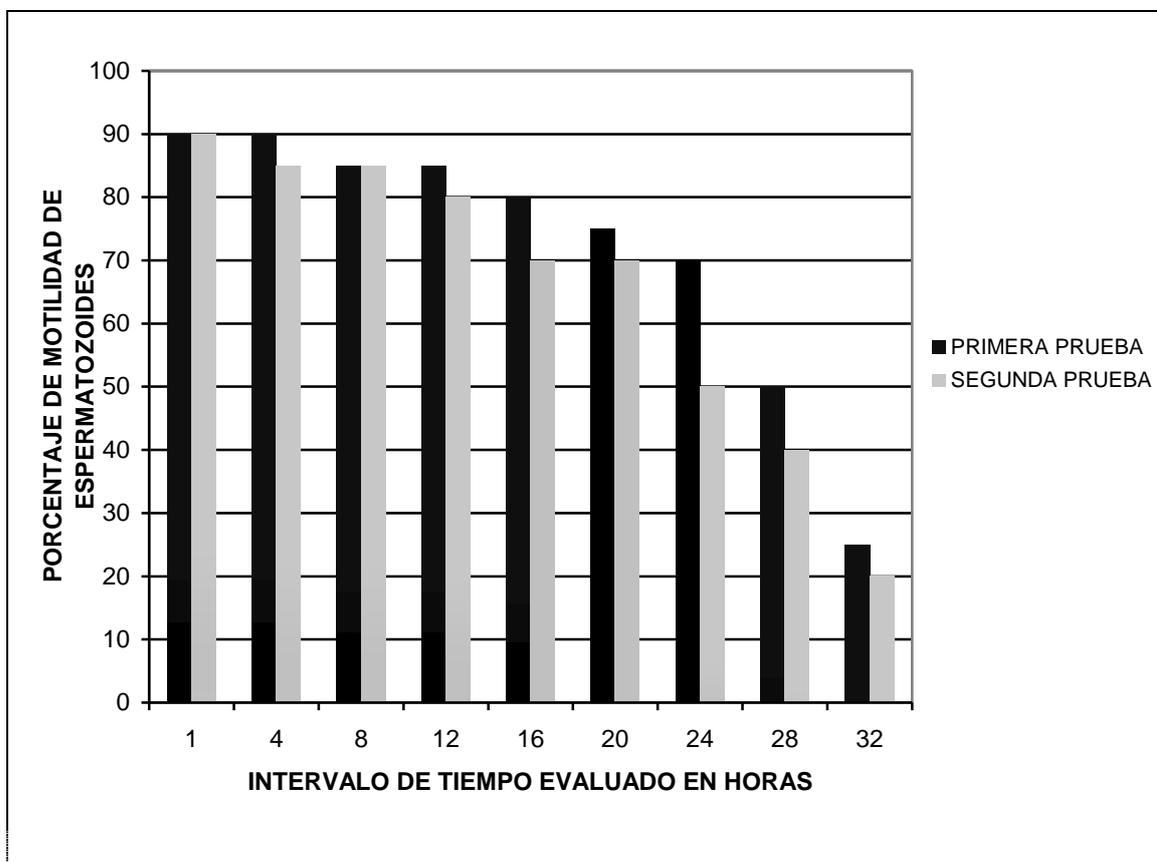
TABLA 7.

**ANORMALIDADES DE ESPERMATOZOIDES A DIFERENTES HORAS DE
EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN**

HORA	PRIMERA PRUEBA (PRIMERA SEMANA)	SEGUNDA PRUEBA (SEGUNDA SEMANA)
	ANORMALIDADES	ANORMALIDADES
1	-	-
4	-	-
8	doble cola	-
12	-	-
16	-	-
20	-	-
24	-	-
28	cola quebrada	-
32	-	-

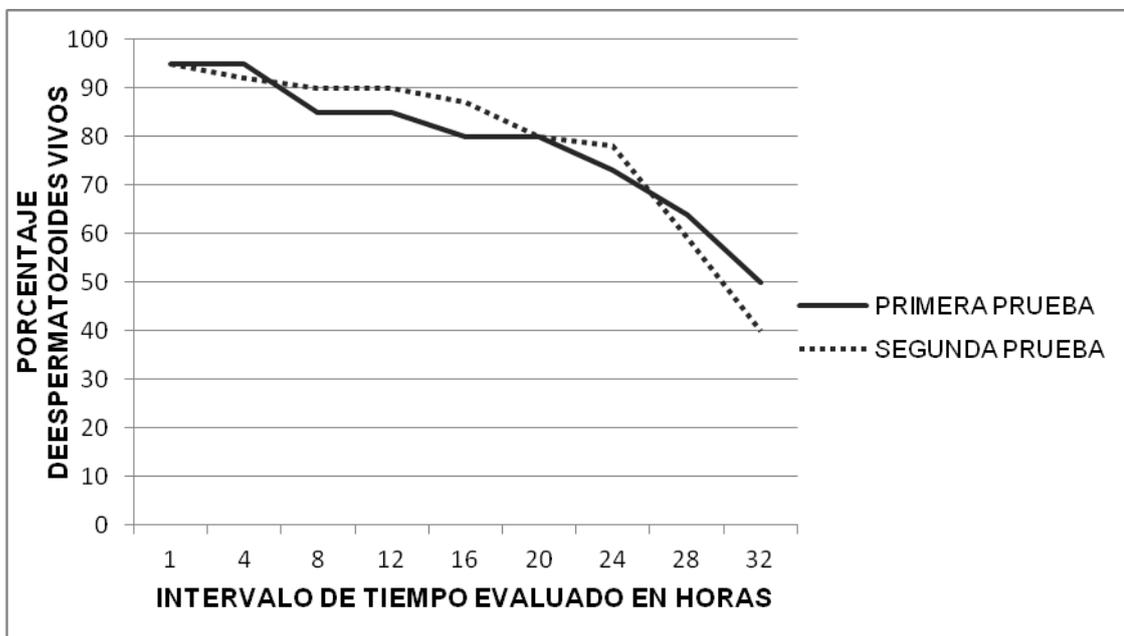
GRÁFICA 1.

PORCENTAJE DE MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES A DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN



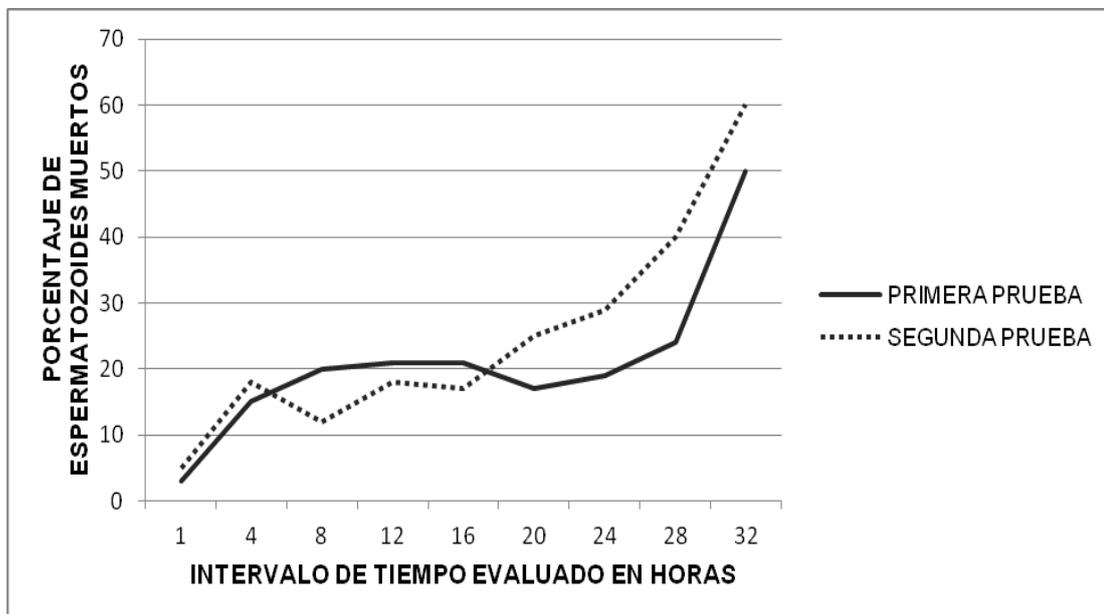
GRÁFICA 2.

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS A DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN



GRÁFICA 3.

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS A DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN



GRÁFICA 4.

**NUMERO DE AGLUTINACIONES DE ESPERMATOZOIDES A
DIFERENTES HORAS DE EVALUACIÓN POST-DILUCIÓN**

