

N° 66
251



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EVALUACION DE LA MOTILIDAD Y DAÑO
ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO
DILUIDOS EN BTS UTILIZANDO GENTAMICINA Y
NEOMICINA COMO ANTIBIOTICOS, ALMACENADO
DURANTE TRES DIAS.**

T E S I S

Presentada ante la División de Estudios
Profesionales de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del Título de

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P o r :

JUAN CARLOS FALCON ZAVALA

Asesores: M.V.Z. Alejandro Toledo Catalán
M.V.Z. Alejandro Mendoza Arias
M.V.Z. Ma. Elena Trujillo Ortega
M.V.Z. Javier de J. Valencia Méndez

México, D. F.

1992



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
REVISION DE LA LITERATURA	6
HIPOTESIS	19
OBJETIVO	19
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	25
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	32
LITERATURA CITADA	33

RESUMEN

FALCON ZAVALA JUAN CARLOS. "Evaluación de la motilidad y daño acrosomal de espermatozoides de cerdo diluidos en BTS utilizando gentamicina y neomicina como antibióticos, almacenados durante tres días" (Bajo la dirección de los MVZ. Alejandro Toledo Catalan, Alejandro Mendoza Arias, Ma. Elena Trujillo Ortega y Javier de Jesús Valencia Méndez).

Se evaluó la motilidad progresiva y la morfología acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en la Solución Descongelante de Beltsville (BTS) con neomicina y gentamicina como antibióticos, durante tres días. Se utilizaron diez sementales: tres Yorkshire, tres Duroc, dos Landrace, un Hampshire y un Hampshire-Duroc. Se prepararon muestras con el eyaculado completo, colectando tres veces a cada uno de los verracos con una diferencia de tres días entre cada colección. Una fracción de cada muestra se diluyó en el diluyente BTS con neomicina, otra con gentamicina y una tercera sin antibiótico, todas contenían una concentración de 4×10^9 espermatozoides en 80 ml. de BTS. El semen diluido se almacenó entre 15 y 18°C, la motilidad y la morfología acrosomal se evaluaron a las 0, 24, 48 y 72 hrs. En las pruebas de "t" realizadas, la motilidad y normalidad acrosomal (NAR) variaron significativamente ($P < 0.05$) con el tiempo de almacenaje, pero no se presentó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos al analizar la motilidad progresiva, pero sí se encuentra diferencia significativa ($P < 0.05$) en lo que respecta a NAR, observando una mejor conservación en el semen diluido con neomicina hasta por 48 hrs. Se concluye que aunque el semen de cerdo diluido en BTS con neomicina se conserva por mayor tiempo en cuanto a la NAR, ninguno de los tratamientos conservó el semen en condiciones de ser empleado en la inseminación artificial más allá de las 24 hrs. a causa de la baja en la motilidad progresiva a las 48 hrs.

INTRODUCCION

La reproducción y el crecimiento constituyen los dos factores biológicos fundamentales de la producción animal. A los procesos reproductivos y a sus resultados les corresponde la máxima importancia zootécnica y económica, por ser la base de la cría como de la producción (4). Por ello se hace más necesaria la búsqueda de nuevas técnicas para que los sistemas de explotación de los animales domésticos sean lo más eficientes posibles (42).

El manejo reproductivo del verraco, dentro de las empresas porcícolas es de suma importancia, ya que los progresos genéticos que se tengan se deben en gran parte al semenal. Con el uso de la inseminación artificial (I.A.) la eficiencia reproductiva de los cerdos se ve ampliamente favorecida; de cada verraco se obtiene semen suficiente para servir centenares de hembras (9,10,42).

En México la I.A. en el cerdo no ha alcanzado la difusión que merece y no existe razón que impida el utilizarse como procedimiento práctico y eficiente (10). Por tal motivo se han desarrollado pruebas que permiten valorar la calidad y fertilidad del semen con objeto de preservarlo sin reducir su fertilidad (13, 43).

Dentro de la producción porcina, la I.A. juega un papel muy importante como factor zootécnico y de organización para lograr una producción más intensiva. La implementación de su uso ha permitido conseguir ventajas en el control reproductivo y establecer programas de mejoramiento genético (4,11,13,43).

Sin embargo, la I.A. también tiene desventajas: una de ellas es que su ejecución requiere de personal capacitado y material adecuado; por otro lado, está el rápido deterioro de los espermatozoides en diluentes para mantener su fertilidad en estado líquido, las alteraciones ocurren en la motilidad y morfología acrosomal de los espermatozoides y se incrementan con el tiempo de almacenaje debido en gran parte a la contaminación bacteriana (4,12,13,42); además, por medio del semen existe la posibilidad de transmitir enfermedades a las cerdas inseminadas y consecuentemente a la granja (4,12,13), de aquí la necesidad de emplear un antibiótico eficaz en el semen diluido.

La obtención de buenos resultados en la I.A. en cerdos depende del nivel de desarrollo de las técnicas de procesamiento, conservación y aplicación del semen, las cuales han tenido grandes avances en las últimas décadas. El semen de cerdo puede preservarse de dos maneras: en estado líquido o en congelación (4, 42). Pero el alto costo del material usado para la congelación y descongelación del semen, lo laborioso del método y a los bajos porcentajes de sobrevivencia espermática después del congelamiento, ha causado que el método de preservar y utilizar semen congelado sólo se realice para semen de verracos de gran valor genético. El uso del semen líquido ha sido más amplio gracias a que su implementación es más económica (4,25,26).

Desde la década de los sesentas se han desarrollado diluentes efectivos para preservar la capacidad fertilizante del espermatozoide (9,11,17,18). Pero, muy pocos de estos diluentes tienen

la capacidad de almacenar el semen más allá del tercer día de su colección sin que se registre una caída abrupta en los porcentajes de viabilidad y fertilidad (11,17,24,25), éste es uno de los principales problemas que limitan el desarrollo de la I. A. (24).

Experimentos comparativos a nivel de campo han situado a la Solución Descongelante de Beltsville (BTS) como el mejor preservador de la integridad y funcionalidad del espermatozoide de cerdo para I.A. (1,2,23).

La contaminación bacteriana del semen, constituye un riesgo tanto para el almacenamiento del semen, como para la salud reproductiva de la cerda (9,12,24). La disposición anatómica del divertículo prepucial del cerdo favorece que durante la monta se produzca la contaminación del semen. Además, la práctica en la I.A., consiste en la conservación del semen a temperatura ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), que posibilita el crecimiento bacteriano (12,43).

La opción más idónea para el control bacteriano en el semen diluido de cerdo es la adición de antibióticos en el diluyente (9,24). Así mismo, es bien sabido que muchas bacterias han llegado a adquirir resistencia hacia varios tipos de agentes antibacterianos. Por lo tanto, es necesario poner atención continuamente a este problema y utilizar antibióticos apropiados con los que se logre una reducción en la cuenta bacteriana en el semen almacenado sin provocar un efecto adverso en los espermatozoides (22,37,41).

Estudios de la flora microbiana en el semen de verraco y la susceptibilidad a drogas, indican que las bacterias aisladas fueron susceptibles en mayor porcentaje a la gentamicina, seguido por la neomicina, kanamicina (40,45), eritromicina, polimixina B y tilocina; y en menor grado a la bacitracina, clo₂ ranfenicol, clortetraciclina, dihidroestreptomocina, novobiocina, oxitetraciclina, penicilina, sulfadiazina, sulfisomidina, sulfisoxazole, sulfa triple, nitrofuranos, tetraciclina y viomicina (45).

Waltz et al. (45), determinaron que los porcentajes de motilidad fueron mayores después del almacenaje en presencia de neomicina, polimixina-B y penicilina.

Como es inevitable el daño que sufren algunos espermatozoides durante su almacenaje y dada la importancia de su integridad y fisiología al momento de inseminar, se considera necesario que para evaluar el semen, no sólo se evalué por el método de motilidad sino también se evalué determinando el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAF) pues junto con esto, sería un mejor criterio para valorar la calidad del semen (8, 29, 30, 36). Al obtener los resultados de motilidad y NAF a diferentes períodos de almacenaje se puede inferir cual es el tiempo máximo para poder utilizarlo en la I.A. sin tener una disminución significativa en su capacidad fertilizante (4, 26).

REVISION DE LA LITELATURA

-Colección de Semen.

Se han descrito diversos métodos para la colección del semen de verraco, los cuales involucran la estimulación directa de la musculatura del aparato genital del macho o simulan la influencia de la vagina sobre el pene, estos métodos son: la vagina artificial, la técnica de la mano enguantada y la electroeyacuación (15,36).

Vagina Artificial. Varios autores han utilizado el método de vagina artificial para la colección de semen de verraco (14,16, 20). Este método es el que más se parece a las condiciones naturales, con el se pretende simular la temperatura, presión, lubricación y posición de la vagina de la hembra, con el objetivo de obtener del macho los mejores resultados (13,15,36,38).

El uso de la vagina artificial esta muy extendido en bovino y equino, sin embargo en el caso del cerdo es solamente usado en la República Democrática de Alemania (21).

Técnica de la Mano Enguantada. Es el método más generalizado para la colección del semen de verraco en la mayoría de los países (3,6,15,17) debido a que es relativamente fácil, práctico y barato (16).

Básicamente con esta técnica y utilizando la mano se simula la presión que producen los anillos cervicales sobre la porción espiral del pene lo que estimula el reflejo de eyacuación al verraco (6,23).

En estas dos técnicas para la colección del semen de verraco se utiliza una hembra en calor o lo que es más común un maniquí para que sea montado en el proceso de colección. Los verracos tienen muy poca dificultad para acostumbrarse al maniquí y su entrenamiento suele ser rápido (14).

Electroeyaculación. Para el uso de este método se requiere de sedación o anestesia general (16). Una sonda bipolar se introduce dentro del recto, la cual produce pulsaciones de bajo voltaje que estimulan la musculatura del aparato genital dando lugar a la eyaculación (15,35). La electroeyaculación se recomienda para cerdos que tienen libido reducida o bien con problemas de locomoción (13,35).

-Características del Eyaculado.

El eyaculado está formado por una porción líquida y una sólida o gelatinosa, este gel no es importante y puede ser eliminado filtrando el eyaculado a través de una gasa que cubra el recipiente de colección (6,16).

Se emite primero una fracción clara preespermática usualmente de 5 a 15 ml, seguida por cantidades variables de la porción gelatinosa (16,20), la siguiente fracción es una porción líquida de color cremoso, que se conoce como fracción rica, y varía en volumen de 50 a 120 ml (20). Se ha observado que durante la colección del semen la porción rica en espermatozoides es emitida en varias fracciones durante la eyaculación (6). Después de ésta, es emitida una fracción clara pobre en espermatozoides (20).

Generalmente durante el eyaculado se emiten de 150 a 500 ml de semen con un contenido de 250 a 350 X 10⁶ espermatozoides por ml (15,35).

Aunque es común el uso de la fracción rica de espermatozoides del eyaculado, en recientes investigaciones, se ha encontrado que el semen obtenido durante el eyaculado de la fracción rica, contenía espermatozoides con mayor incidencia de gota citoplasmática en la porción distal que el eyaculado completo, por lo que se sugiere que para la inseminación debería utilizarse el eyaculado completo (6).

-Frecuencia de la Colección de Semen.

La pubertad del semental porcino se presenta, por término medio, cuando cuenta con cinco o seis meses de edad. A medida que la edad del cerdo aumenta, se eleva el número total de espermatozoides en el eyaculado. De tal manera que desde los ocho meses de edad los verracos jóvenes pueden ser colectados una o dos veces por semana, aunque sin sobrepasar el máximo de seis eyaculados mensuales (21). Los verracos de más de un año de edad se pueden incluir en el ritmo normal de obtención de semen, es decir, de dos a tres eyaculados por semana y un máximo de ocho a nueve por mes (13,15,20,35).

Las eyaculaciones repetidas de un grupo de verracos, de más de un año de edad, a intervalos de cuatro, dos y un día produjeron cantidades totales de 54.9 X 10⁹, 39.5 X 10⁹ y 23.7 X 10⁹ espermatozoides por eyaculado respectivamente. Esto sugiere la posibilidad de coleccionar el semen de los verracos diariamente

con resultados satisfactorios (38). Sin embargo, Fillo (35) menciona que las colecciones deben ajustarse a intervalos de tres a ocho días. Jones (20) recomienda obtener tres eyaculados por semana para cerdos adultos.

Al aumentar la frecuencia en la obtención de semen de un eyaculado cada dos semanas a dos eyaculados por día disminuyeron los valores referentes a volumen, concentración total por eyaculado, y se elevó la incidencia de gota citoplasmática distal y formas anormales en la región de la cola (6).

-Evaluación del Semen.

Un método exacto para estimar la capacidad fertilizante del semen sería una herramienta extremadamente útil para todos los interesados en la reproducción animal. Aunque el desarrollo de tal método haya sido durante mucho tiempo una meta, intentos p^asados para seleccionar el macho más fértil dentro de un grupo han sido desilusionantes. Este problema se hace más aparente cuando consideramos que la fertilidad del espermatozoide es una función biológica muy compleja (6).

Aunque todavía no se dispone de ningún método o procedimiento que permita determinar por medición directa el poder fecundante del semen de verraco, se conocen, no obstante algunas de las características que debe exhibir el semen de buena calidad, las que se determinan mediante pruebas in vitro (21, 36).

El principal objetivo de los métodos in vitro para medir el potencial de la capacidad fertilizante, es determinar cuales o cuantas células son funcionalmente competentes para llevar a

efecto el proceso de fertilización (6). Los criterios más comunmente usados en la calificación del semen son: El número total de espermatozoides en el eyaculado (es de 30 a 60 X 10⁹), el volumen (el cual varía de 100 a 500 ml), la motilidad progresiva (que sea mayor al 70%), las anomalías primarias (menores de el 10%) y las anomalías secundarias (menores al 15%) (21,35, 38).

Motilidad Progresiva. La evaluación de la motilidad es uno de los criterios más usados para determinar la calidad del semen de verraco antes de ser sometido al proceso de dilución, y después de diluido (13,36).

La evaluación de la motilidad debe hacerse inmediatamente después de colectado el semen, la muestra se debe colocar en una laminilla tibia, limpia y seca, y observarse a bajo aumento (10 X) (15,16,37). Los métodos para medir la motilidad van desde el método anterior, que es muy subjetivo, hasta métodos tan sofisticados como el análisis de la motilidad por medio de la cinematografía, estos métodos aún usando computadoras para su análisis no demostraron ventajas sobre la evaluación menos costosa con el microscopio. De la misma manera se ha observado que la motilidad y la fertilidad aunque tienen una correlación positiva, es baja (6,13).

Morfología del Espermatozoide. En muchos de los trabajos clásicos sobre la morfología del espermatozoide se demostró que la infertilidad en el macho puede estar asociada a algunos cambios morfológicos en la población espermática (6). Esto coincide con

trabajos más recientes en los que se afirma que cerdos con una producción de espermatozoides cuya forma se desvía de lo normal han sido totalmente estériles o por lo menos subfértiles (2, 36).

Los defectos del espermatozoide se han dividido en dos grupos; 1) Anormalidades primarias; Son aquellas que se desarrollan durante la espermatogénesis y son causadas por procesos patológicos en el epitelio germinal y 2) Anormalidades secundarias; Son las desviaciones que probablemente se originan después de que las células espermáticas abandonan al testículo (13, 38).

El acrosoma es la porción del espermatozoide que se encuentra moldeada sobre el núcleo y cubierto por la membrana acrosomal, rodeada a su vez por la membrana espermática. Un espermatozoide con acrosoma intacto no puede penetrar un óvulo por lo que no puede liberar su contenido, esta reacción debe ocurrir en presencia del óvulo ya que de otra manera pierde su capacidad fertilizante es por esto que la integridad del acrosoma es una buna medida de la capacidad fertilizante del esperma (6, 36).

Durante los años recientes el examen morfológico del acrosoma espermático con el microscopio de contraste de fases ha sido un valioso criterio para la evaluación de los espermatozoides (13, 31, 36).

Pursel et al. (30), categorizan en cinco grupos la morfología del espermatozoide de acuerdo a la integridad del acrosoma; A) NAR si la capa acrosomal se adhiere suavemente al núcleo y posee un borde apical liso, B) NAR' espermatozoides similares a

los NAR excepto por la adherencia de pequeñas partículas a la capa acrosomal y capa postnuclear, C) DAR espermatozoides que fueron identificados por una diseminación del límite posterior del anillo apical formando un anillo apical de forma irregular, D) MAR espermatozoides carentes de anillo apical, pero la capa acrosomal anterior permanece estrechamente adherida a la cabeza del espermatozoide, E) LAC espermatozoides caracterizados por la vesiculación de la capa acrosomal anterior.

La motilidad y la morfología acrosómica guardan una relación inseparable (6), Pursel et al. (29), estudiando la motilidad a gran aumento vieron que los espermatozoides clasificados como DAR y MAR frecuentemente son móviles pero los LAC no lo son y los NAR se encuentran móviles o inmóviles.

Rillo et al. (34), encontraron que siguiendo un método que incluye la reducción de la presión osmótica, el efecto del plasma seminal, de la cafeína y el calor, más del 90% de las células con acrosomas normales o dañados son capaces de recuperar la motilidad, incluso los que al microscopio de contraste de fases se consideran perdidos, esto aporta una evidencia más de que la motilidad no puede ser un criterio adecuado para la evaluación del semen.

-Número de Espermatozoides por Dosis.

Durante el desarrollo de técnicas prácticas para la I.A. en el cerdo, se hicieron numerosos ensayos para determinar la concentración y el volumen óptimos para alcanzar una buena fertilidad y obtener un número considerable de dosis sin afectar la fertilidad (6).

Baker et al. (5), encontraron que si usaban diferentes concentraciones de espermatozoides en un volúmen de 20 ml de diluyente, ni siquiera la concentración más alta (10×10^9) de espermatozoides usada, era capaz de alcanzar los oviductos o fecundar los óvulos. En el mismo trabajo, cerdas primerizas inseminadas con 100 ml de semen diluido tuvieron una alza significativa en la proporción de huevos fertilizados y más espermatozoides alcanzaron la zona pelúcida, que en aquellas inseminadas con 200 ml de semen. La inseminación con dos dosis de 5×10^9 o 10×10^9 espermatozoides resultó en un significativo número de espermatozoides en el oviducto y en mayor número de huevos fertilizados, que usando una dosis de 1×10^9 espermatozoides. Está sufiere que para inseminar una cerda el volúmen debe ser mayor de 20 ml y cercano a los 100 ml y el número de espermatozoides cercano a 5×10^9 .

En general hasta ahora el volúmen y la concentración usados en la I.A. porcina ha variado de 2×10^9 hasta 5.5×10^9 (6).

-Diluentes para Semen Preservado en Estado Líquido.

Con el propósito de prolongar la vida fértil de los espermatozoides más allá del día de su colección, se han elaborado varios tipos de diluentes, los cuales difieren entre si por el tipo de ingredientes que contienen y la concentración a la que se encuentran (17,18,25). Algunos muy utilizados, con semen preservado en estado líquido actualmente se incluyen el Kiev, la Solución Descongelante de Beltsville (BTS), Zorlesco, Modena, Beltsville liquid-1 (BL-1), Illinois Variable Temperature (IVT), SCK,

(IVT modificado) y Kharkov (Trillan B) y MR-A (9,11,17,18). Todos ellos requirieron al ser diluidos con el semen, mantenerse a una temperatura de almacenaje de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pero muy pocos de estos diluyentes tienen la capacidad de almacenar el semen más allá del tercer día de su colección sin que se registre una mar cada caída en los porcentajes de viabilidad y fertilidad (17,24, 25,42), éste es uno de los grandes problemas que limitan el desarrollo de la I.A. (24).

Se han realizado esfuerzos para encontrar el diluyente que ase gure una larga preservación del semen, tal es el caso del semen almacenado en el diluyente IVT saturado con CO_2 almacenado durante 5 días a una temperatura de 15°C con el cual se han obtenido niveles aceptables de concepción y tamaño de la camada (25).

Aalbers et al. (1), compararon la fecundidad del semen de cerdo diluido y almacenado en BTS, Kiev, Zorlesco y Modena a $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando dosis con una concentración de 3×10^9 espermatozoides aplicados en diferentes granjas al tercer día de su co lección, encontraron porcentajes de pariciones que varían de 59 a 100% para BTS; 47 a 87% para Kiev; 50 a 73% en Zorlesco y 49 a 74% en Modena.

Algunas pruebas de campo realizadas en Holanda para comparar la fertilidad en cerdas primerizas y adultas bajo condiciones prácticas de manejo, utilizando BTS, Kiev, Zorlesco y Modena co mo diluyentes para el semen. Se inseminaron más de 60,000 cerdas, observando que el BTS fué ligeramente superior que el Kiev (74.8% contra 71.4%) y significativamente superior a Zorlesco y Modena

(65.2% y 58.1% respectivamente). Las conclusiones dan resultados de fertilidad más satisfactorios para la I.A. con semen preservado en BTS durante dos días (18).

Por otra parte, Pursel (28), al comparar los diluentes BL-1, BTS, Kiev y Modena a tres temperaturas diferentes (15, 19 y 23°C) y a siete días de almacenaje en dos diferentes tipos de tubo conteniendo 70 ml cada uno con una concentración de 40×10^6 espermatozoides por ml, encontró que el porcentaje de motilidad en semen almacenado en BTS fué superior al almacenado en los otros diluentes. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAF) fué similar en BTS y Kiev y significativamente inferior en BL-1 y Modena.

Aalbers et al. (2), utilizaron en un experimento semen diluido en BTS y almacenado de 16 a 18°C por periodos de 2 a 10, 20 a 28, 26 a 34 y 44 a 52 horas, observaron que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal disminuye significativamente con el tiempo. Además señala que el porcentaje de pariciones fué significativamente superior en el semen almacenado de 20 a 28 horas que el almacenado de 44 a 52 horas (82.9 contra 78.5%).

El espermatozoide de cerdo es muy sensible al cambio de temperatura, ya sea, disminución o aumento, la primera es más dañino sobre la morfología del espermatozoide que la segunda. Esto exige que el semen después de diluido se mantenga a un rango de temperatura de almacenaje entre 15 y 18°C que es el ideal. Mantener este rango es difícil si el semen se transporta a otros lugares para su utilización (4).

-Contaminación Bacteriana del Semen.

El conocimiento de la flora habitual del saco prepucial de los cerdos es conveniente si consideramos la gran difusión que está tomando la I.A. en esta especie; la disposición anatómica del divertículo prepucial favorece que durante la monta se produzca la contaminación del semen. Por otra parte la práctica en la I.A. consiste en conservar el semen a temperatura ambiente, que posibilita el crecimiento bacteriano (12,43).

La mayoría de las bacterias habituales del divertículo prepucial se encuentran libres en el contenido líquido y en la superficie de la mucosa, algunas como las leptospiras, están dentro de la mucosa. En algunas granjas donde la metritis postpartum ocurría en forma epizootica, los verracos estaban infectados con: Corynebacterium sp., Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Escherichia coli, Pseudomonas sp. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la flora bacteriana del divertículo prepucial en 100 verracos utilizados en forma intensiva en granjas de la periferia del D.F., Estado de México, Queretaro y Morelos estaba constituida por bacterias pertenecientes a once géneros: Escherichia coli, Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Corynebacterium, sp., Proteus sp., Pseudomonas sp., Klebsiella sp., Aerobacter sp., Gaffky sp., Nocardia sp. y Bacillus sp. Por lo tanto el estudio de la flora bacteriana del divertículo prepucial ofrece grandes ventajas en la profilaxis de enfermedades infecciosas que pueden ser diseminadas rápidamente mediante el uso de la I.A. (12).

-Antibióticos Empleados en el Semen.

Salisbury et al. (8), determinaron que los agentes antibacterianos son especialmente útiles para controlar los microorganismos presentes en el semen diluido almacenado a temperaturas más elevadas de 15 a 18°C, descubrieron que la adición de sulfas, penicilina, estreptomocina o algunos otros antibióticos elevaba la fertilidad obtenida con semen almacenado a temperatura ambiente y siempre tenía una fuerte interacción con el animal.

Muchas bacterias han resultado ser resistentes a varios tipos de agentes antimicrobianos. En el campo de la I.A. con semen en estado líquido es necesario poner atención a este problema. Para inhibir el crecimiento de microorganismos en el semen, se ha utilizado penicilina, estreptomocina, polimixina-B u otras combinaciones de antibióticos que cubren un amplio espectro bacteriano (3).

Waltz et al. (45), desarrollaron estudios bacteriológicos de semen de verraco, donde los objetivos fueron: Caracterizar los tipos, determinar el número de bacterias en el semen bajo condiciones de campo, y evaluar el efecto de los agentes antibacterianos en el crecimiento bacteriano y la motilidad espermática durante el almacenamiento. Un total de 70 muestras de semen se obtuvieron de 13 cerdos, resultando que las colonias bacterianas observadas por mililitro de semen variaron desde 0 hasta 3800 por muestra individual, los microorganismos aislados fueron representantes de ocho géneros: Escherichia coli, Aerobacter sp., Proteus sp., Corynebacterium sp., Pseudomonas sp. Sta

-phylococcus sp., y Bordetella sp. Entre los 16 diferentes anti bacterianos probados los más efectivos en el control bacteriano cuando se evaluó semen almacenado a 16°C fueron neomicina, polimixina-B, eritromicina, tilocina y sulfadiazina, así como viomicina el menos efectivo. Los niveles de motilidad fueron mayores después del almacenaje en presencia de neomicina, polimixina-B y sulfadiazina.

Lingam y Campbell (22), compararon la sensibilidad para la penicilina, estreptomocina, cloromicetina, terramicina, neomicina, aureomicina, bacitracina, eritromicina y tetraciclina para el espectro completo de microorganismos encontrados en el semen de dos cerdos. Las bacterias fueron resistentes a penicilina y bacitracina, pero sensibles a los otros antibióticos estudiados.

Rahman et al. (33), aislaron Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Proteus sp., Klebsiella aerogenes, Streptococcus sp., Pseudomona aeruginosa y Bacillus sp., demostrando que la gentamicina con la neomicina y kanamicina fueron efectivos mientras que la penicilina y estreptomocina fueron los de menor efectividad.

Estudios de la flora microbiana del semen de verraco y la susceptibilidad a drogas indicaron que las bacterias aisladas comúnmente fueron Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa, Bacillus sp., donde el 100% de las bacterias fueron susceptibles a la gentamicina y el 80 al 90% a la neomicina y a la kanamicina. La penicilina y la estreptomocina son utilizados en los diluentes, encontrándose que el 80% de las bacterias eran resistentes

a estos. Además, se observó que las bacterias incrementaron su resistencia a la tetraciclina, nitrofuranos y ampicilina (40).

Por lo anterior, la adición controlada de antibióticos específicos de amplio espectro, promovería la supervivencia espermática durante períodos de almacenamiento más prolongados, obteniendo el máximo de fertilidad (37,43).

HIPOTESIS.

La utilización de neomicina a la concentración de 0.05 g/lit. en los diluentes de semen de verraco almacenado de 15 a 18°C, proporciona una mejor calidad y fertilidad del semen que la gentamicina a la concentración de 0.032 g/lit.

OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo fué comparar el porcentaje de motilidad y daño acrosomal en el semen de cerdo diluido en BTS, utilizando neomicina contra semen diluido con gentamicina y almacenados durante tres días.

MATERIAL Y METODOS

A. LOCALIZACIÓN.

El muestreo del presente trabajo se realizó en la Granja Experimental Porcina Zapotitlán (G.E.P.Z.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), que se encuentra ubicada en la parte Sureste de la Cuenca del Valle de México, a la altura del kilómetro 21.5 de la carretera México-Tulyehualco en la calle Manuel M. López S./N. dentro del perímetro del pueblo de Zapotitlán, delegación Tláhuac, D.F., geográficamente se localiza a los $19^{\circ}18'$ de latitud Norte y a $99^{\circ}2'30''$ de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich a una altura sobre el nivel del mar de 2,242 m. y con una presión de 589 mm. de Hg, según la clasificación de climas de Köppen, esta región pertenece al tipo (CN), templado con lluvias en verano (43).

La evaluación de la morfología acrosomal se realizó en el laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción e Inseminación Artificial de la F.M.V.Z. (U.N.A.M.), ubicado en Ciudad Universitaria, México, D.F.

B. ANIMALES EXPERIMENTALES.

Se utilizaron diez sementales; Tres Duroc, tres Yorkshire, dos Landrace, un Hampshire y un híbrido (Hampshire-Duroc), de diferentes edades que pertenecen al programa de I.A. de la G.E.P.Z.

C. DILUENTE.

Se preparó la Solución Descongelante de Beltsville (BTS) en

agua desionizada (42) con y sin antibióticos, utilizando 0.5 g de neomicina y 0.032 g de gentamicina por litro.

D. GRUPOS EXPERIMENTALES.

Cada semental fué colectado tres veces a intervalos de tres días entre cada colección. Se colectaron tres eyaculados (durante 10 semanas en los meses de Septiembre a Noviembre), haciendo un total de treinta eyaculados. Cada eyaculado se diluyó por separado en el BTS con neomicina, gentamicina y sin antibiótico.

E. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Se obtuvo el semen en el corral de colección, utilizando el potro de monta, siguiendo el método de la mano enguantada descrito por Melrose (23).

Se procedió a evaluar el semen, como se describe a continuación:

- Motilidad.

Primeramente con una pipeta Pasteur se cogió una gota de semen y se colocó entre una termoplatina y un cubreobjetos, con una temperatura entre 35 y 37°C, procediéndose a evaluar el porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides en el microscopio óptico, con el objetivo seco débil (10X) y seco fuerte (40X).

- Morfología.

Se determinó el porcentaje de espermatozoides anormales de cada eyaculado por medio de un frotis utilizando un colorante de Eosina-Nigrosina (4). Una vez realizado el frotis se observó con el microscopio óptico utilizando el objetivo seco fuerte,

se procedió a contar 200 células espermáticas, determinando el porcentaje de espermatozoides anormales en el eyaculado.

- Concentración.

Utilizando una pipeta de Thoma se hizo una dilución de 1:200 tomando como soluto al semen y como solvente una solución de Citrato de Sodio al 3.6% con formalina. Posteriormente se homogenizó, agitando suavemente, y se tiraron las cinco primeras gotas de la dilución, las siguientes dos gotas se colocaron en las dos cámaras cuentaglobulos que integran la cámara de Neubauer, una gota para cada cámara, y se procedió a contar en el microscopio óptico con el objetivo seco fuerte, de la siguiente manera: Cada cámara tiene un cuadrículado de 25 áreas, se tomaron en cuenta únicamente las áreas de las esquinas y la central, en ellas se contaron solamente los espermatozoides que estaban dentro de cada área y sobre las líneas del lado izquierdo y superior con la cabeza hacia adentro. Se sumó el número de espermatozoides contados en cada cámara y se dividió entre dos para obtener el número promedio. Para calcular la concentración espermática por mililitro de eyaculado se aplicó la fórmula siguiente (13):

$$\text{No. de espermatozoides/ml} = (\text{No. de espermzs. contados})(10,000).$$

- Calculo de Dosis.

Para calcular el número de dosis por eyaculado se realizó el siguiente procedimiento:

$$\text{No. de espermzs. vivos} = (\text{No. de espermzs./ml})(\% \text{ de motilidad})$$

$$\text{Espermatozoides vivos por inseminación} = 4 \times 10^9$$

Volúmen de semen por dosis = $\frac{\text{Espermss. vivos por inseminación}}{\text{No. de espermss. vivos}}$

No. de dosis por eyaculado = $\frac{\text{Volúmen total del eyaculado}}{\text{Volúmen de semen por dosis}}$

Volúmen de diluyente por dosis = 80ml - Vol. de semen por dosis.

-Dilución.

Para la dilución se utilizó el diluyente BTS, mantenido en refrigeración de 2-4°C. Para la dilución se calentó en baño María para igualar su temperatura a la del semen colectado y mantenido en el término de plástico entre 32 y 35°C, cuando la temperatura de ambos fué igual se realizó la mezcla, depositando el diluyente al semen, deslizándolo suavemente por la pared del recipiente y homogenizando la mezcla.

Las dosis se almacenaron en botellas de plástico forradas con papel para proteger a los espermatozoides de la luz solar, estas fueron colocadas en una caja de poliuretano cerrada con la finalidad de almacenarlas a una temperatura entre 15 y 18°C.

-Evaluación de las Muestras.

En el semen recién colectado se valoró el volúmen total del eyaculado, la motilidad, concentración y morfología espermática.

Los porcentajes de motilidad y espermatozoides con acrosoma normal (NAR) fueron evaluados en las muestras a cuatro diferentes tiempos: A las 0, 24, 48 y 72 horas después de la dilución.

La evaluación de la motilidad se realizó de la manera ya descrita. Para evaluar la morfología acrosomal se tomaron dos o tres gotas del semen diluido y se mezclaron con 1 ml de la Solución para Evaluación del Acrosoma descrita por Puschel (32) para fijar los espermatozoides, la cual se compone de 96 partes

de una solución de Citrato de Sodio al 2.9% y 4 partes de una solución de formalina al 37%. Una vez hecha la fijación de los espermatozoides se conservaron en refrigeración para su evaluación posterior en el laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción e I.A. de la F.M.V.Z. (U.N.A.M.), en donde se tomó una gota de los espermatozoides fijados y se colocó entre un porta y un cubreobjetos, posteriormente se observó en el microscopio de contraste de fases con un objetivo de Ph 3 (100/1.3el), contándose doscientas células espermáticas y determinando de ellas el porcentaje de NAR presentes en la muestra.

F. ANALISIS ESTADISTICO.

Para determinar el efecto del tiempo se aplicó un análisis de varianza de las medias por muestra y total entre horas y entre muestras por horas con un nivel de rechazo $P < 0.05$. Para determinar el efecto de cada tratamiento en cada uno de los tiempos (0 a 24, 24 a 48 y 48 a 72 hrs.), se realizó una prueba de "t" de student para cada grupo (7).

RESULTADOS

Al analizar los resultados en lo referente a la motilidad, no se encontró una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la diferencia de las medias de los tres tratamientos en el mismo tiempo de almacenaje (Cuadro 1).

En la proporción de acrosomas normales al realizar el estudio de diferencia de medias, tampoco presentó diferencia significativa ($P > 0.05$), al analizar los tres tratamientos en un mismo tiempo de almacenaje (Cuadro 2).

Al realizar la prueba de "t" para ver la diferencia de los tratamientos al pasar el tiempo (0, 24, 48 y 72 hrs.). En esta prueba tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en ninguno de los grupos al hacer referencia a la motilidad. Pero en lo que respecta a acrosomas normales, las muestras almacenadas con neomicina se mantuvieron significativamente ($P < 0.05$) con mejor calidad que el semen diluido con gentamicina y sin antibiótico hasta el período de 24 a 48 hrs.

Estos resultados nos indican que el semen se conservó en condiciones para ser inseminado únicamente hasta por 24 hrs. después de su dilución (21, 35, 38).

CUADRO 1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de cerdo almacenado durante 3 días en BTS con neomicina, gentamicina y sin antibiótico.

Tiempo	0 horas			24 horas			48 horas			72 horas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1er. semana												
\bar{X}	78	78	78	73.5	72	62.5	58	53	45	36	31.5	16.5
S	2.6	2.6	2.6	5.8	7.5	19.2	19.9	23.9	24.2	30.3	28.8	22.5
2da. semana												
\bar{X}	78	78	78	74	73.5	71	48.5	46	36.5	25.5	20.5	21
S	3.5	3.5	3.5	6.1	4.7	5.67	21.7	23.7	24.9	28.8	25.4	25.58
3era. semana												
\bar{X}	78.5	78.5	78.5	69.5	70	64.5	63.5	60.5	50	42.5	34.5	24.5
S	2.4	2.4	2.4	11.9	9.1	12.1	13.5	13.1	22.5	33.0	29.2	28.7

*Tratamiento

1. Neomicina

2. Gentamicina

3. Sin Antibiotico

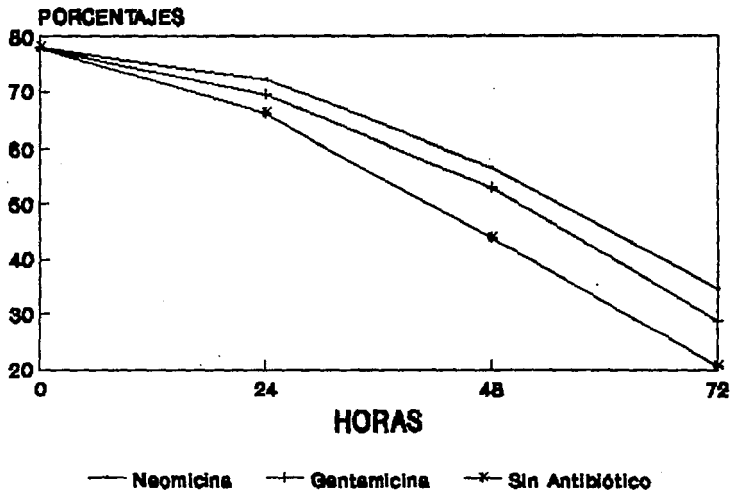
CUADRO 2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la cantidad de espermatozoides de cerdo con acrosoma normal, almacenado durante 3 días en BTS con neomicina, gentamicina y sin antibiótico.

Tiempo	0 hrs.			24 hrs.			48 hrs.			72 hrs.		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1er. semana												
\bar{X}	93.2	93.4	93.5	90.0	90.6	88.8	87.2	87.5	85.5	82.8	83.1	77.6
S	5.5	5.5	4.0	5.1	7.3	7.0	6.7	7.7	6.6	8.6	9.5	10.10
2da. semana												
\bar{X}	92.3	93.4	92.8	88.5	88.3	86.4	85.5	85.1	82.1	80.3	80.7	74.2
S	4.5	3.6	3.9	6.3	6.7	5.0	7.9	7.4	5.4	10.1	8.17	10.58
3era. semana												
\bar{X}	94.3	92.3	89.9	91.7	87.5	87.7	87.6	85.8	83.4	82.3	84.1	78
S	2.4	4.3	6.1	3.6	5.9	3.7	5.2	6.1	3.3	10.3	7.7	5.8

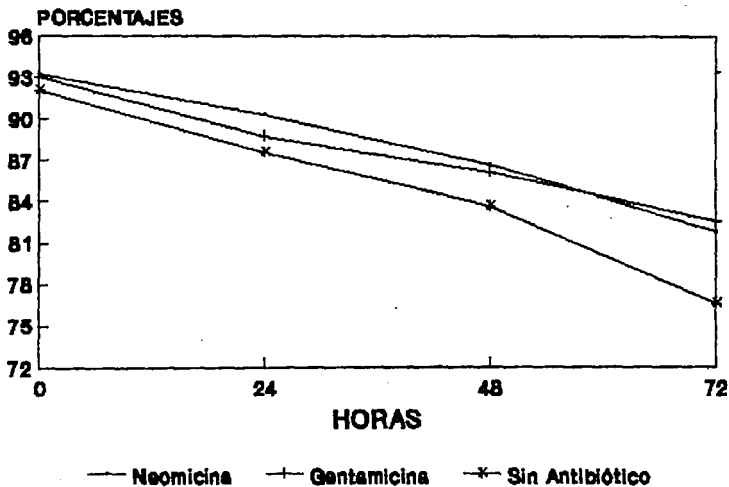
* Tratamientos:

1. Neomicina
2. Gentamicina
3. Sin Antibiótico

**GRAFICA 1. Motilidad del semen diluido
en BTS de 10 sementales.**



GRAFICA 2. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal diluidos en BTS.



DISCUSION

El procesamiento, tipo de eyaculado y el tiempo de almacenaje del semen diluido de cerdo para la I.A., tienen un efecto significativo sobre la motilidad progresiva y la calidad de espermatozoides con acrosoma normal (NAR), debido a que estas células sufren cambios irreversibles en su motilidad y morfología acrosomal durante su procesamiento en el laboratorio (19,44). Además tales cambios se incrementan con el tiempo de almacenaje debido a la presencia de proteínas básicas del plasma seminal que incrementan la permeabilidad de la membrana espermática permitiendo la salida de proteínas, cationes celulares y enzimas citoplasmáticas, que son indispensables para apoyar el proceso de capacitación o maduración espermática (29). Aunado a esto, el acúmulo de productos metabólicos como amoníaco, ácido láctico, pirúvico y carbónico, también afectan la integridad del espermatozoide (6,13,27,39).

La valoración de la calidad del semen resulta esencial para seleccionar las dosis destinadas a la I.A. La motilidad es uno de los criterios más utilizados para estimar la calidad de la muestra ya que informa la viabilidad celular. El porcentaje de espermatozoides con NAR proporciona una información adicional de gran valor sobre la viabilidad de las dosis (8,28,30,36).

Los esfuerzos realizados para encontrar un diluyente que asegure una larga preservación del semen, han reportado los mejores resultados empleando el BTS, el cual mantiene una adecuada cali

-dad en su motilidad, espermatozoides con NAR e inclusive en su porcentaje de pariciones, en semen almacenado hasta por tres días a una temperatura de entre 15 y 18°C (1,2,18,28), lo que difiere del presente trabajo, en el cual el tiempo máximo de almacenaje, con buena calidad de motilidad progresiva y espermatozoides con NAR fué de 24 hrs. Esto puede deberse a la susceptibilidad de los espermatozoides a los cambios de temperatura, ya que dentro de la caja de poliuretano ésta no puede controlarse como es deseable.

La motilidad disminuyó más rápidamente que el porcentaje de espermatozoides con NAR durante el almacenaje, debido a que la primera es más afectada por el enfriamiento y a que el espermatozoide de cerdo es muy sensible a ello, además del efecto causado por las enzimas y metabolitos liberados durante el almacenaje.

En diversos experimentos con el semen líquido de cerdo se han empleado diferentes antibióticos para evitar la proliferación bacteriana y que no dañen la integridad del espermatozoide, de estos la gentamicina y neomicina son los que han reportado los mejores resultados (22,33,40,41,45). En el presente trabajo se obtuvieron resultados muy similares con el semen de cerdo almacenado en estado líquido en el diluyente BTS adicionado con diferentes antibióticos en lo referente a la integridad acrosomal, pero no fué así en cuanto a la motilidad progresiva.

CONCLUSIONES

En las condiciones en que se procesó y evaluó el semen con cualquiera de los dos antibióticos evaluados, se considera que el tiempo máximo de almacenaje para su utilización en la I.A. es de 24 horas, tiempo en que se obtuvo 73.2 y 89.53% de motilidad y espermatozoides con NAR respectivamente.

Se concluye que si se desea inseminar con semen de 0 a 24 hrs. de almacenado éste deberá tener un antibiótico como la neomicina o la gentamicina, ya que las condiciones fisiológicas de los espermatozoides en lo que se refiere a motilidad y morfología acrosomal se conservan mejor, y ayudará a prevenir la transmisión de enfermedades en el hato reproductivo, aún cuando la diferencia con el semen sin antibiótico no sea significativa ($P > 0.05$) en este trabajo, ya que como se mencionó anteriormente, la temperatura del almacenaje no pudo ser controlada; y por otro lado el estado reproductivo de los sementales evaluados se encontraba bajo, muy probablemente por la época del año en que se realizó el experimento (Septiembre-Noviembre), ya que se ha observado que en la época de verano baja considerablemente la calidad del semen.

Para una conclusión definitiva esto deberá ser corroborado con estudios donde se inseminen cerdas utilizando semen diluido en ETS con neomicina a diferentes tiempos de almacenaje y se comparen las tasas de fertilidad alcanzadas con uno y otro antibiótico.

LITERATURA CITADA

1. Aalbers, J.G., Johnson, L.A., Rademaker, J.H.W. and Grooten, H. J.G.: Use of boar spermatozoa for A.I.: fertility and morphology of semen diluted in BTS and used for insemination within 24h or 25h after collection. Pig News Inf., 6: 174 (1985).
2. Aalbers, J.G., Rademaker, J.H.W., Grooten, H.J.G. and Johnson, L.A.: Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions. J. Anim. Sci., 57 (suppl. 1): 314-315 (1983).
3. Aalbers, J.G. and Smith, W.J.: Use of semen more than 24 hours old in pig A.I. Pig News Inf., 5: 390 (1984).
4. Amézaga, C.G.: Evaluación del daño acrosomal en espermatozoides de semen de cerdo almacenado en BTS. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1987.
5. Baker, E.D., Dziuk, P.J. and Norton, H.W.: Effect of volumen of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. J. Anim. Sci., 27: 88-93 (1968).
6. Castañeda, M.J.: Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes y después de la congelación sobre la fertilidad, morfología y motilidad de los espermatozoides. Tesis de maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
7. Daniel, W.W.: Biostatística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. LTMUSA, México, D.F., 1984.

8. De Alba, J.: Reproducción animal. En: Inseminación Artificial. Editado por: De Alba, J., 239-260 Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1985.
9. Derivaux, J.: Dilución y conservación del esperma fresco. En: Reproducción de los Animales Domésticos. Editado por: Derivaux, J., 184-228. Acribia, Zaragoza, España, 1976.
10. Escamilla, V.A.: Revisión de la literatura sobre la inseminación artificial del porcino. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1975.
11. Galina, C., Santiel, A., Valencia, J., Becerril, J., Bustamante, G., Calderon, A., Duchateau, A., Fernández, S., Olguín, A., Páramo, R. y Zarco, L.: Reproducción de los Animales Domésticos. LYMUSA, México, D.F., 1986.
12. García, V.A.: Determinación de las bacterias aerobias, presentes en el divertículo prepucial de verracos aparentemente sanos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1968.
13. Hafez, E.S.E.: Artificial insemination. In: Reproduction in Farm Animals. Edited by: Hafez, E.S.E., 455-497. Lea and Febiger, Philadelphia, 1987.
14. Hess, E.A., Ludwig, T.M. and Teague, H.S.: Artificial insemination of swine. Ann. Zootech., 8: 31-36 (1956).
15. Hunter, R.H.F.: Male, semen production and animal insemination. In: Reproduction of Farm Animals. Edited by: Hunter, R.H.F., 26-53. Longman, London, 1982.

16. Hurtgen, J.P., Larssen, F. and Crabo, B.: Factors affecting the semen quality in the boar. Proceedings of the 9th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid, Spain., 1980. 271-274. Madrid, Spain. (1980).
17. Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willems, C.M.T., Rademaker, J.H.M. and Rexroad, C.E.Jr.: Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 13°C. J. Anim. Sci., 54: 132-136 (1982).
18. Johnson, L.A. and Aalbers, J.G.: Artificial insemination of swine. Fertility using several liquid semen diluents. Proceedings of the 8th. International Pig Veterinary Society Congress. Ghent, Belgium., 1984. 293. Ghent, Belgium. (1984).
19. Jones, R.C.: The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa. J. Reprod. Fert., 33: 179-183 (1973).
20. Jones, R.C.: Uses of artificial insemination. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners. Cincinnati, Ohio., 1983. 98. Cincinnati, Ohio. (1983).
21. König, I.: Inseminación de la Cerda. Acribia, Zaragoza, España, 1979.
22. Lingam, S.A. and Campbell, E.A.: Artificial insemination of pigs in Australia II. Handling and preservation of semen. Australian Vet. J., 41: 151 (1965).
23. Melrose, D.R.: A review of progress and of possible developments in the artificial insemination of pigs. Vet. Rec., 78: 159-167 (1966).

24. Novoa, O.A.: Efecto inhibitor de la gentamicina sobre la proliferación bacteriana de semen porcino diluido en BTS almacenado durante tres días. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
25. Paugnon, M. and Court, M.: Advances in boar semen preservation technology in France. Pig News Inf., 2: 397-400 (1981).
26. Pérez, S.E.: Fertilidad en cerdas inseminadas con semen diluido en GEPZ o en BTS. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
27. Pérez, P.F.: Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones. Científico-Médica, Barcelona, España, 1985.
28. Pursel, V.G.: Preservation of boar semen above 15°C: Effect of storage temperature, extender and container. J. Anim. Sci., 57 (suppl.2): 125-126 (1983).
29. Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Rampacek, G.B.: Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci., 34: 278-283 (1972).
30. Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L.: Acrosome morphology of boar spermatozoa during in vitro aging. J. Anim. Sci., 38: 113-116 (1974).
31. Pursel, V.G. and Johnson, L.A.: Gluteraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology, 1: 63-68 (1974).

32. Püschel, C.R.: Vorkommen und Fertilitäts diagnostische Bedeutung von morphologisch abweichenden Samenzellen in Ebersperma unter besonderer Berücksichtigung der sogenannten anhängenden Protoplastropfen. Tierärztliche Hochschule. Hannover, Dissertation (1984).
33. Rahman, H., Dutta, J.C., Boro, B.R. and Rajkonwar, G.K.: Studies on bacterial flora of bull semen and their antibiotic spectra. Vet. Bull., 54: 282 (1984).
34. Rillo, S.M., Vázquez, I. y Alias, E.: Recuperación de la motilidad espermática y su relación con acrosomas en el semen de verraco conservado y congelado. Proceedings of the 9th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid, Spain. 1980. 403. Madrid, Spain. (1980).
35. Rillo, S.M.: Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Aedos, Barcelona, España, 1982.
36. Saake, R.G.: Semen quality in relation to sperm preservation. J. Dairy Sci., 66: 2635-2644 (1983).
37. Sone, M., Ohmura, K. and Bamba, K.: Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. Vet. Rec., 111: 11-14 (1982).
38. Sorensen, A.M.Jr.: Reproducción Animal: Principios y Prácticas. McGraw-Hill, México, D.F., 1982.
39. Strzezek, J., Smiglelska, J. and Liminowicz, J.: Metabolism of boar semen diluted in different diluents and stored at 18-20°C. Plac News Inf., 3: 116 (1982).
40. Tamuli, M.K., Sharma, D.K. and Rajkonwar, G.K.: Studies on the microbial flora of boar semen. Int. Vet. J., 61: 858-861 (1984).

41. Thaker, G.J., Larssen, R.E., Joo, H.J. and Leman, A.D.: Swine diseases transmissible with AI. J. Am. vet. med. Ass., 185: 511-516 (1984).
42. Tinoco, J.J.L.: Motilidad y daño acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en diluentes BB y BTS durante 7 días. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
43. Toledo, C.A.: Efecto inhibitor de la penicilina y estreptomicina sobre la proliferación bacteriana de semen porcino diluido en BTS almacenado durante tres días. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1990.
44. Vengust, M., Illera, M.J., Senegacnik, J., Petac, D. and Bester, M.: Relation between some boar semen characters and adaptability to liquid storage and freezing. Pig News Inf., 5: 489 (1984).
45. Waltz, F.A., Foley, C.W., Henschler, R.C., Tiffany, L.W. and Lisaka, B.J.: Bacteriological studies of boar semen. J. Anim. Sci., 27: 1357-1362 (1968).