

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**COMPARACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL DE SEMEN PORCINO
PRESERVADO EN DILUYENTES COMERCIALES VS
CONVENCIONALES**

ASESOR

PROF. RICHARD MUDARRA

ALICIA A. JUÁREZ O.

CIP. 9-757-679

I SEMESTRE

2024

**COMPARACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL DE SEMEN PORCINO
PRESERVADO EN DILUYENTE COMERCIAL VS CONVENCIONAL**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE INGIENERIO AGRÓNAMO ZOOTECNISTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O
PARCIAL DEBE SER OBTENIDO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

APROBADO:

PROF. ING. RICHARD MUDARRA M.Sc.

ASESOR

PROF. ING. ALEX SOLÍS Ph.D.

MIEMBRO

PROF. ING. NEFTALÍ APARICIO M.Sc.

MIEMBRO

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2024

AGRADECIMIENTO

A Dios y la virgen, por guiarme hasta aquí, brindarme constancia y sabiduría para afrontar cada obstáculo superado y enfrentado.

A mis padres Felisa Otero y Alexander Juárez, por ser mis pilares, por apoyarme, amarme incondicionalmente y por hacerme la persona que soy hoy.

A mi abuela Alicia, por ser siempre uno de los pilares más importantes de mi vida, por ser uno de mis mayores ejemplos a seguir, por sus consejos, su apoyo, dedicación y su amor incondicional.

A mi abuelo José, que, aunque ya no esté a mi lado, siempre ha sido mi norte e inspiración en todos los aspectos de mi vida.

A mi novio Jose Lamas, por nunca dejarme sola, por respaldar cada uno de mis pasos, por ser mi apoyo y siempre haber estado para ayudarme.

A mi señora Nelly, por haberme dado una familia y haberme hecho sentir como en casa aun estando lejos de ella.

A mis profesores, por siempre motivarme a ser mejor estudiante y profesional todos los días.

A mi asesor y profesor Richard Mudarra, por su paciencia y apoyo en todo el proceso de la tesis.

Al Ingeniero José Kaa y a todo el equipo de porcino por nunca haberme dicho no, y por haberme brindado su ayuda en todo momento.

A la licenciada Alexandra Samudio, por su amabilidad y siempre buscar el tiempo y la manera de ayudarme con la confección del diluyente siempre que fue necesario.

RESUMEN

La inseminación artificial es una técnica biotecnológica de gran impacto en la mejora genética. Sin embargo, el costo de los diluyentes comerciales disponibles limitan su utilización. Este estudio tuvo como objetivo comparar el efecto de un diluyente convencional vs diluyente comercial sobre la calidad seminal en cerdos. Un semental adulto de la raza Pietrain fue utilizado para la colecta de cuatro eyaculados con intervalos de 6 días entre eyaculados. El semen fue diluido en dos tratamientos, obteniendo 14 muestras por tratamiento de cada eyaculado y refrigeradas a 16 °C. Los tratamientos fueron: DCOM) semen diluido en un diluyente liofilizado comercial; y DC) semen diluido en un diluyente convencional. Dos muestras por tratamiento fueron utilizadas para determinar la motilidad espermática individual (MI%), porcentaje de espermatozoides vivos (EV%) dos horas posterior a la dilución y cada 24 horas por siete días. Se determinó el costo de diluyente por muestra procesada. No hubo diferencias entre tratamientos para la MI% y EV% entre tratamientos ($p>0.05$). En cuanto a los días de evaluación, hubo diferencias significativas para la MI%, con valores ideales para ambos tratamientos hasta el día 3 post dilución ($p<0.05$). Adicionalmente, no hubo diferencias significativas para EV% entre los días de evaluación ($p>0.05$); sin embargo, numéricamente, ambos tratamientos mantuvieron valores dentro de los rangos hasta el día 3 posterior a la dilución. Los costos de diluyentes para las dosis de DCOM y DC fueron de \$0.70 versus \$0.11, respectivamente. En conclusión el diluyente convencional mostró una similar capacidad de mantener las características seminales que el diluyente comercial hasta el día 3 posterior a la dilución, con un menor costo de inversión en diluyentes.

ABSTRAC

Artificial insemination is a biotechnological technique with great impact on genetic improvement. However, the cost of available commercial extenders limit their use. The objective of this study was to compare the effect of a conventional extender vs. a commercial extender on semen quality in pigs. An adult male, Pietrain breed, was used to collect four ejaculates with intervals of 6 days between ejaculates. The semen was diluted in two treatments, obtaining 14 samples per treatment from each ejaculate and refrigerated at 16 °C. The treatments were: DCOM) semen diluted in a commercial lyophilized extender; and DC) semen diluted in a conventional extender. Two samples per treatment were used to determine individual sperm motility (IM%), percentage of live sperm (EV%) and percentage of dead sperm (ME%) two hours after dilution and every 24 hours for seven days. The cost of diluent per sample processed was determined. There were no statistics differences between treatments for MI% and EV% ($p>0.05$). Regarding the days, there were significant differences for the MI%, with ideal values for both treatments until day 3 post dilution ($p<0.05$). Additionally, there were no significant differences for EV% between days ($p>0.05$); However, numerically, both treatments- maintained values within the ranges until day 3 after dilution. Extender costs for each DCOM and DC doses were \$0.70 versus \$0.11, respectively. The conventional extender showed a similar capacity to maintain seminal characteristics as the commercial extender until day 3 after dilution, with a lower investment cost.

Key words: dilution, sperm, ejaculate, motility, semen.

Índice

AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	v
ABSTRAC	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. MARCO TEÓRICO	2
1.1. Sistema Reprodutor Del Macho.....	2
1.2. Partes del Aparato Reprodutor del Verraco:.....	2
1.2.1. Testículos.....	2
1.2.2. Epidídimos.....	2
1.2.3. Conductos deferentes.....	2
1.2.4. Uretra.....	2
1.2.5. Pene.....	2
1.2.6. Glándulas accesorias.....	3
1.3. Modificaciones Químicas del Espermatozoide Durante la Maduración:.....	3
1.4. Colección De Semen.....	3
1.5. Factores Que Influyen En La Calidad Del Semen.....	4
1.5.1. Edad.....	4
1.5.2. Nutrición.....	4
1.5.3. Ritmo de colección.....	5
1.5.4. Raza.....	5
1.5.5. Estación.....	5
1.5.6. Volumen.....	6
1.5.7. pH.....	6
1.5.8. Concentración espermática.....	6
1.5.9. Aire.....	6
1.6. Dilución De Semen.....	7
1.7. Diluyentes.....	7
1.8. Tipos de diluyentes.....	8
1.9. Diluyente de corta duración.....	8
1.10. Diluyente de larga duración.....	9

1.11.	Inseminación Artificial Ventajas Y Desventajas	10
	Ventajas	10
	Desventajas	10
1.12.	Anormalidades morfológicas	11
1.13.	Las anomalías del espermatozoide se clasifican en función de:	11
1.14.	Función y componente del diluyente BTS:	12
1.15.	Efectos de la contaminación microbiana sobre la vida útil de las muestras	13
II.	MARCO METODOLÓGICO	14
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
IV.	CONCLUSIONES	24
V.	RECOMENDACIONES	25
VI.	BIBLIOGRAFÍA	26
VII.	ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del diluyente convencional BTS.	16
Tabla 2. Efectos de diferentes diluyentes sobre variables seminales en cerdos: promedio de la fase experimental.	17
Tabla 3. Efectos de diferentes diluyentes sobre las diferencias entre los días de muestreo.	19
Tabla 4. Componentes del diluyente BTS y sus costos.	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Evaluación seminal en el laboratorio.	37
Anexo 2. Evaluación de motilidad y porcentaje de vivos y muertos.	37
Anexo 3. Evaluación de dosis seminales.....	38

INTRODUCCIÓN

La combinación de los avances en las biotecnologías en reproducción animal asistida en la especie porcina permite hoy día abrir un amplio horizonte en la reproducción y producción animal en beneficio de la optimización de la eficiencia reproductiva de esta especie (Córdova, 2017). En sistemas de producción porcina intensiva, los sementales determinan su eficiencia, como la capacidad de dosis producidas de semental por semana (Rocha *et al.*, 2005).

La inseminación artificial, ha desempeñado un papel importante en la crianza del ganado porcino contribuyendo al progreso genético con una mejora en los rendimientos (Arisnabarreta & Allende, 2017). La dilución del semen y su posterior enfriamiento tiene como objetivo reducir la actividad metabólica de la célula espermática, disminuyendo el consumo de energía (Althouse *et al.*, 1998). De esta forma, se consigue rentabilizar al máximo al eyaculado y optimizar el manejo en la granja (Gómez *et al.*, 2008).

Algunas de las ventajas que confieren los diluyentes, incluyendo los convencionales, es el uso de una concentración espermática baja, que permite realizar más inseminaciones con una sola recolección, y manteniendo una adecuada motilidad de las células espermáticas (Cuenca & Avellaneda, 2017). Sin embargo, el alto costo de los diluyentes comerciales es una limitante para los pequeños productores que no pueden costear este tipo de técnicas reproductivas. Basado en lo antes mencionado, se justifica la realización de este estudio donde se evaluarán fórmulas convencionales de diluyentes para la preservación del semen porcino.

Este estudio tuvo como objetivo la evaluación de la fórmula de un diluyente convencional y determinar su capacidad preservadora de las características seminales en comparación a aquellas obtenidas por diluyentes comerciales disponibles en el mercado.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Sistema Reproductor Del Macho

La función principal de todo el aparato reproductor masculino es producir espermatozoides, hormonas masculinas y transportar esos espermatozoides en su función reproductora (Aragon, 1987). El aparato reproductor del macho consta de testículos, epidídimo, conductos deferentes, uretra, pene y glándulas sexuales accesorias (Sánchez, 2019).

1.2. Partes del Aparato Reproductor del Verraco:

1.2.1. Testículos

Órganos sexuales primarios con función exocrina (producción celular de espermatozoides) y endocrina (producción de las células de Leydi y de Sertoli).

1.2.2. Epidídimos

Consta de cabeza, cuerpo y cola. En la cabeza y cuerpo se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, mientras que en la cola se reabsorben y fagocitan las gotas citoplasmáticas de los espermatozoides hasta que son expulsados (aproximadamente 14 días) (Williams, 2013; Estrada & Martínez, 2017; Trujillo *et al.*, 2017). Además, si no hay eyaculación los espermios son absorbidos por la cola del epidídimo.

1.2.3. Conductos deferentes

Transportan a los espermatozoides hacia la uretra (Galina, 2009; Trujillo *et al.*, 2017).

1.2.4. Uretra

Conducto encargado tanto del transporte de la orina fuera de la vejiga, como los espermatozoides y del líquido prostático en el eyaculado (Alamo, 2007).

1.2.5. Pene

Órgano sexual externo que permite el apareamiento, posee forma de tirabuzón, permitiendo adaptarse al cérvix de la cerda en el momento de la cópula, clasificándose como fibroelástico (Galina, 2009; Trujillo *et al.*, 2017).

1.2.6. Glándulas accesorias

Aportan la porción líquida al semen, se compone de sustancias nutritivas que ayudan a mantener la viabilidad de los espermatozoides. Estas son: próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales o de Cowper, y otras menores que segregan el plasma seminal que constituirá junto con los espermatozoides el eyaculado final. La secreción de la próstata contiene ácido cítrico, ácido ascórbico, proteínas, lípidos y azúcares, constituyendo hasta el 60% del volumen total del eyaculado. Las vesículas seminales sirven como depósito y secretan material mucoso rico en fructosa y otras sustancias nutritivas, y prostaglandinas. La secreción, de las glándulas bulbouretrales es gelatinosa (tapioca) y constituye la última parte del eyaculado (Galina, 2009; Trujillo *et al.*, 2017).

1.3. Modificaciones Químicas del Espermatozoide Durante la Maduración:

Entre las modificaciones que puede experimentar el espermatozoide durante su maduración se encuentran cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana y cantidad de colesterol en proporción a los fosfolípidos; incremento de las uniones disulfuro; incremento de la carga neta negativa de la superficie; relocalización de antígenos de superficie; modificación, eliminación y adición de proteínas de superficie (Cuasnicú *et al.*, 1984; Cooper, 1998).

Mencionan Frenette y Sullivan (2001) en sus estudios que en las modificaciones proteicas se observan que muchas de estas proteínas están asociadas a la superficie del espermatozoide y poseen anclajes glicosil-fosfatidilinositol (GPI). El GPI es un glicolípido cuya función biológica es el anclaje de proteínas a la membrana celular (Díaz *et al.*, 2017).

Las proteínas de origen epididimario y las que se encuentran ancladas a la membrana plasmática por GPI, son secretadas por un mecanismo desconocido (Kirchhoff y Hale, 1996).

1.4. Colección De Semen

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

programar a los machos a intervalos óptimos, prepararlos sexualmente y aplicar técnicas correctas (Hafez, 1996).

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

Mazzarri *et al.* (1986), determinaron que, al aumentar la frecuencia de uso, disminuía en 76% el número de espermatozoides por eyaculado en verracos con recolecciones diarias. El efecto es más acentuado sobre la cantidad que sobre la calidad.

1.5. Factores Que Influyen En La Calidad Del Semen

1.5.1. Edad

Influye sobre el volumen y concentración espermática (Frunza *et al.*, 2008). La espermatogénesis inicia entre los tres a cuatro meses de edad y la erección del pene es posible observarlo a los cinco meses, por ello los primeros eyaculados se colectan a partir de los siete a ocho meses, cuando el reproductor alcanza entre 70 a 100 kilos vivo (Weitze, 2000).

Según Cameron & Vickers (1986) la concentración de los espermatozoides se incrementa considerablemente a partir de los 7 a 8 meses hasta el año de edad, luego se mantiene hasta la etapa de adulto.

Williams (1981); Del Toro *et al.* (1986); Coraza *et al.* (1990) y Gil *et al.* (1991); establecen que al igual que el volumen, las variables motilidad y concentración espermática se encuentran influenciadas por la edad de los sementales.

1.5.2. Nutrición

Para obtener un eyaculado con buenas características es necesario manejar a los reproductores de manera individual y mantener un plan nutricional correcto (Marchesi y Cesarini, 2012).

Durante la etapa de crecimiento es necesario controlar la ganancia de peso vivo diaria (GPVD) para obtener eyaculados de calidad. Marchesi y Cesarini (2012) mencionan que las ganancias de peso vivo mayores a 190 gramos diarios afectan la motilidad espermática de manera negativa, y cuando incrementa a 248 gramos

diarios se asocia con menor volumen de semen y un incremento de anomalías espermáticas.

1.5.3. Ritmo de colección

La frecuencia de las colecciones presenta una correlación inversa con el volumen del eyaculado y la concentración espermática (Strzezek *et al.*, 2000; Rodríguez & Wallgren, 2000).

Es correcto no someter al verraco a un ritmo de colecta elevado a efectos de no agotar las reservas, ni espaciar demasiado las mismas con el fin de mantener un estímulo constante a la producción del semen (Villa, 2015).

Mazzarri *et al.* (1986) menciona que, al aumentar el número de colecciones, el volumen del eyaculado disminuye un 20% en las frecuencias de dos y tres veces por semana, con reducciones mayores si el semen es extraído todos los días.

La frecuencia elevada de colecciones en el verraco origina alteraciones en el patrón de secreción y reabsorción de los fluidos del epidídimo, que ocasionarían defectos en la maduración y anormalidades en la motilidad de los espermatozoides (Pruneda *et al.*, 2005).

1.5.4. Raza

Influye en el volumen y concentración espermática del eyaculado. En los estudios de Ramírez *et al.* (2000) el volumen del eyaculado del cerdo criollo varió entre 39 a 155 mL, en comparación con los cerdos de razas comerciales los cuales presentan volúmenes de semen entre 241 a 250 mL.

En los últimos años, con los nuevos métodos computarizados de evaluación, se ha determinado que la raza tiene influencia sobre la motilidad y fertilidad. El efecto del verraco individual explica el 29% y 31% de la variación total de la tasa de fertilidad (TF) y número de lechones nacidos vivos (LNV) en cerdas; mientras que la línea genética explica el 22% y 18% de la variación de TF y LNV, respectivamente (Broeckhuijse *et al.*, 2012).

1.5.5. Estación

Se observa disminución del volumen seminal durante los meses cálidos (Colenbrander & Kemp, 1990), disminución del número total de espermatozoides por eyaculado (Colenbrander & Kemp, 1990), disminución de la motilidad (Trudeau

& Sanford, 1986), aumento de la incidencia de malformaciones y del pH (Trudeau & Sanford, 1986), aumento del porcentaje de espermatozoides con acrosoma anormal (Wettemann *et al.*, 1976) y disminución de la fertilidad (Weitze, 2000).

La temperatura ambiental óptima para obtener un buen eyaculado es 20°C. Temperaturas elevadas por encima de 35°C, con periodos cortos de exposición de 16 horas, generaron en los verracos un menor volumen y una disminución del poder fecundante del eyaculado, por daños en la espermatogénesis (Cameron, 1986).

1.5.6. Volumen

La gran variación del volumen seminal se explica por el tamaño de las glándulas seminales y bulbouretrales, y al grado de estimulación sexual alcanzado antes de la colecta (Cooper, 1980).

1.5.7. pH

Los bajos o elevados niveles de la secreción de las glándulas sexuales accesorias son determinantes para que el pH del semen tenga una reacción alcalina o más ácida (King & Macpherson, 2005).

El semen con un pH elevado, por encima de 8, es indicador de un eyaculado de baja calidad o que el verraco tiene un proceso infeccioso en el tracto genital. Las variaciones de pH entre eyaculados de un mismo reproductor pueden ser generados por el pH del epidídimo, que es ácido (entre 5,9 a 6,9), originado por la permanencia de los espermatozoides en estado de anabiosis e inamovilidad (Frunza *et al.*, 2008).

1.5.8. Concentración espermática

El eyaculado del verraco se caracteriza por tener baja concentración, que excepcionalmente no pasa de los 500,000 espermatozoides/mm³ de semen (Tardif, 1999).

1.5.9. Aire

Debe evitarse el contacto con el aire durante el almacenamiento, ya que aumenta el pH, lo que se correlaciona negativamente con la motilidad de los espermatozoides (Vyt *et al.*, 2004). Por lo tanto, se utilizan muchos sistemas tamponadores diferentes para estabilizar el pH.

1.6. Dilución De Semen

La dilución y conservación del semen porcino en refrigeración es una práctica que brinda a la industria porcina la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco. Los diluyentes en donde se conserva el material seminal deben proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (Rugeles *et al.*, 2013).

La membrana del espermatozoide porcino tiene una composición de fosfolípidos diferentes a las de otras especies de mamíferos, con un menor porcentaje de fosfatidilcolina, y mayor de fosfatidiletanolamina y esfingomiélin, y más importante aún, el porcentaje de colesterol. Debido a que la relación colesterol-fosfolípidos es muy baja, y éste está distribuido asimétricamente, estando más presente en la monocapa externa que interna, hace que la interna sea especialmente sensible al choque por frío (Magapor, 2019).

1.7. Diluyentes

Un diluyente se considera aquella solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de fertilidad adecuado hasta el momento de la inseminación artificial (Valencia, 2006).

La principal característica de los diluyentes es mantener viable la célula espermática lo mejor posible por un tiempo determinado (Cuenca *et al.*, 2017).

En base a su composición genérica los diluyentes deben proporcionar la energía para el metabolismo de los espermatozoides, neutralizar residuos metabólicos, mantener el equilibrio osmótico y estabilizar las membranas de los espermatozoides (Cuenca *et al.*, 2017). Además, debe evitar las fluctuaciones de pH mediante sustancias amortiguadoras o tampones (Gómez *et al.*, 2008).

Un diluyente está compuesto por fuentes de energía para que el espermatozoide ascienda por el aparato genital de la hembra; de agentes tamponadores para mantener el pH entre 6,8 y 7,4 el cual le permite reducir el metabolismo y la motilidad de la célula espermática, alargando su vida media; de sales (cloruro de sodio o de potasio) para evitar el shock osmótico y la destrucción celular; y, quelantes de calcio que son sustancias que capturan calcio impidiendo

su utilización por parte del espermatozoide, lo cual prolonga también la vida del mismo (Gómez *et al.*, 2008).

1.8. Tipos de diluyentes

El diluyente utilizado para las dosis seminales es una solución que permite aumentar el volumen del eyaculado del cerdo, aumentar las dosis y preservar las características de los espermatozoides el cual contiene nutrientes que permite que la vida del espermatozoide se alargue ya que es muy sensible al frío por lo que deben estar conservadas a 15 - 20°C, y la disminución de la temperatura hace que pierda viabilidad de las dosis seminales (Gadea, 2003).

Los diluyentes seminales se han clasificados en dos grandes grupos: los de conservación a corto plazo (1-3 días) y aquellos que tienen como objetivo la conservación del semen a largo plazo (más de 4 días) entre 15 - 20°C.

Hernández (2009) expresa que se han utilizados varios tipos de diluyentes para el mantenimiento del semen refrigerado, logrando los mejores efectos con los diluyentes Beltsville Thaw Solution (BTS). Ya que permite mantener viable el material espermático a 17°C durante unos 5 días, con un porcentaje de preñez superior al 80%, demostrando de esta manera que la temperatura de conservación del semen influye ampliamente en cuanto al nivel de fertilidad se refiere (Alemán *et al.*, 2007).

1.9. Diluyente de corta duración

Se utilizan principalmente en lugares donde la distribución de las dosis seminales es a corta distancia, conservan el semen a 15° - 20°C (Rugeles *et al.*, 2013). Sus principales ventajas son la utilización espermática baja, su bajo costo de preparación y baja tasa de motilidad espermática.

Según los estudios de Rueda (2011), este medio se caracteriza por añadir una pequeña cantidad de potasio, que permite mantener la actividad de la bomba sodio/potasio y evita la reducción de potasio intracelular que estaría asociada con la disminución de motilidad espermática.

En la actualidad uno de los diluyentes de corta duración más usado es el BTS (solución de congelación de Beltsville), desarrollado por Pursel & Johnson (1975) para congelar semen de cerdo y posteriormente adaptarlo para la conservación en refrigeración (Pursel *et al.*, 1978).

Ochoa *et al.* (2008) manifiestan que la conservación del semen del cerdo es realizada en base a diluyentes tipo salinos (BTS, Vital, X-Cell, Kiev, Reading, Guelph. IVT, Modena, MR-A, etc.), los cuales no contienen ni leche ni yema de huevo.

Sin duda, el descubrimiento de mayor alcance de Pursel & Johnson (1975) fue el del medio BTS (Betsville Thawing Solution), diseñado inicialmente como medio de descongelación y posteriormente adaptado para semen refrigerado (Johnson *et al.*, 1988). BTS, probablemente el diluyente de semen más utilizado en todo el mundo se caracteriza por contener una pequeña cantidad de potasio. Esta característica preserva la bomba de sodio y potasio y, por lo tanto, evita el agotamiento del potasio intracelular que está relacionado con la reducción de la motilidad de los espermatozoides (Álvarez & Storey, 1982).

1.10. Diluyente de larga duración

Se utilizan en zonas donde el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado el semen es distante (Rueda, 2009).

Son muy complejos, permitiendo conservaciones de 5 a 6 días requiriendo ciertas exigencias en cuanto a la fracción que se va a recoger, tipo de dilución con agua destilada, control elevado de contaminación bacteriana utilizando un antimicrobiano no espermicida, y con una refrigeración entre 15-17°C (Johnson *et al.*, 2000; Bin *et al.*, 2017; Ochoa & Ortega, 2008; Yeste, 2017; Martín *et al.*, 2019).

Según Rueda *et al.* (2009), las principales ventajas que ofrece este diluyente es la posibilidad de transportar el semen a largas distancias, ahorro de importaciones y reducción de costos por concepto de sementales, alimento e instalaciones, además brindan una mejor distribución de las muestras seminales. Con ambos diluyentes se pueden realizar pruebas diagnósticas del semen antes de ser utilizadas, para comprobar la presencia de microorganismos y calidad del semen.

1.11. Inseminación Artificial Ventajas Y Desventajas

Ventajas

- Permite tener un menor número de verracos, con ahorro de espacios y costos de mantenimiento.
- Permite la rápida difusión del material genético de los mejores verracos con características deseadas.
- Permite obtener lotes de lechones más homogéneos.
- Incrementa la velocidad de selección, debido al mayor número de concepciones en menor tiempo.
- Se reduce el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas por vía sexual.
- Se pueden preñar múltiples cerdas en un mismo día, ya que con la inseminación artificial se aumenta el número de servicios por eyaculado (Hidalgo, 2013).
- Permite controlar la calidad espermática de los verracos que están sujetos a múltiples efectos ambientales, de manejo y sanitarios (Kubus, 2011).
- Reduce el estrés de animales con problemas cardíacos o de claudicación durante la monta (Kubus, 2011).

Desventajas

- Si el semen no se transporta y almacena a una temperatura adecuada, podría producir un shock térmico, quedando inservible.
- La falta de experiencia del personal podría lastimar el pene durante la extracción.
- Baja disponibilidad de semen en algunas zonas del país (González, 2018).
- Se expone el semen a diversos factores ambientales, los cuales pueden lograr afectar al mismo (González, 2018).
- Según Cuéllar (2020) se debe reconocer que la optimización y la mejora en los procesos reproductivos de las granjas porcinas con la implementación de servicios de asistencia reproductiva como la Inseminación Artificial (IA), llevan a un mayor rendimiento productivo de estas y mejora de la eficiencia en las crías.

1.12. Anormalidades morfológicas

Las anormalidades se producen por una espermatogénesis defectuosa, consecuencia de la herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (Strickland & Dact, 2000).

1.13. Las anormalidades del espermatozoide se clasifican en función de:

- La **morfología**: cabeza, cola, pieza intermedia y presencia de gotas citoplasmáticas (acúmulos de citoplasma no reabsorbido en el proceso de maduración del espermatozoide) (Barth & Oko, 1989).
- La **importancia**: defectos mayores y menores (Blom, 1983).
- El **origen**: primarias, originadas durante la espermiogénesis en el testículo y secundarias: originadas en el epidídimo o post eyaculación (Barth & Oko, 1989).

Se pueden utilizar técnicas de valoración subjetiva con diversas tinciones (Eosina Nigrosina, Papanicolau, Giemsa, Diff-Quik), por fijación con glutaraldehído o formaldehído de la muestra y la valoración por microscopía de contraste de fases (Arbaiza, 2020). Indistintamente de su clasificación, generalmente se acepta que no deben existir más de un 30% de anomalías morfológicas en los recuentos efectuados (Barth, 2000).

Las anormalidades del espermatozoide se clasifican en primarias y secundarias. Las primarias: se originan en el testículo y se relacionan con defectos de la cabeza espermática, acrosoma y presencia de gota citoplasmática proximal. Las secundarias: se originan en el epidídimo y están relacionadas con la presencia de gota citoplasmática distal y otros defectos del flagelo espermático (Chenoweth, 1997).

Según Gadea (2005) la morfología espermática es un parámetro que parece mostrar una correlación con la fertilidad o al menos una tendencia.

La producción de espermatozoides anormales puede deberse a la edad, problemas nutricionales, enfermedades, factores ambientales (calor, heridas por

traumatismos, sustancias tóxicas, cambio de ambiente), como por razones hormonales o genéticas (Madrid, 2004).

Las alteraciones en la morfología pueden tener un origen genético, por lo cual la importancia de la evaluación de la morfología espermática es determinar la presencia de espermatozoides con formas anormales utilizando la observación de extendidos seminales con diversas coloraciones, como la eosina-nigrosina (Madrid, 2004).

Es el porcentaje de espermatozoides vivos que existan en el semen colectado, aspecto que se mide luego de determinar la motilidad. Para calcular la viabilidad se hace uso de colorantes como eosina-negrosina. El aporte de este colorante se hace mediante la coloración de gametos masculinos muertos; por otro lado, las células reproductoras masculinas que se encuentren vivas no se van a teñir. Para determinar la calidad del semen, se conoce que el porcentaje de espermatozoides vivos debe estar sobre el 70% (Córdova-Izquierdo, 2020).

1.14. Función y componente del diluyente BTS:

- **Glucosa:** utilizada para proporcionar energía, y por su valor energético es la más utilizada, aunque también se puede emplear galactosa, fructosa, ribosa o trehalosa sin que los resultados hayan superado a la glucosa (Cuenca & Avellaneda, 2017).
- **Citrato de sodio:** aporte mineral para garantizar el equilibrio fisicoquímico (pH, equilibrio iónico).
- **EDTA:** anticoagulante que permite evitar la aglutinación y la precipitación de los espermatozoides en el diluyente.
- **Bicarbonato de sodio:** regulador del pH, agente alcalinizante, anti aglutinante, leudante y estabilizante.
- **Cloruro de potasio:** empleadas como reguladoras de la presión osmótica, es conocido que una caída de esta por debajo de los 200 mOsm representa una reducción significativa de la motilidad espermática (Cuenca & Avellaneda, 2017).

1.15. Efectos de la contaminación microbiana sobre la vida útil de las muestras

La contaminación bacteriana es una de las causas más comunes de baja calidad de las dosis conservadas por más de tres días, y actualmente se le resta importancia a la contaminación de dosis seminales. Sin embargo, una colección contaminada y un procesamiento inadecuado pueden resultar en conteos bacterianos altos que se reflejan en resultados pobres en el desempeño reproductivo de las cerdas (Althouse *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000).

Los microorganismos presentes en el semen afectan la viabilidad de los espermatozoides, debido a la competencia por el mismo sustrato y por el efecto nocivo que los metabolitos bacterianos provocan sobre la membrana celular, y que debido a la contaminación se presentan fenómenos de aglutinación, disminución del tiempo de conservación, retorno de las cerdas al estro y descargas vaginales posteriores a la inseminación (Acosta *et al.*, 2011).

El semen se puede contaminar como consecuencia de procedimientos higiénicos deficientes durante la colección, evaluación y envasado (Martínez, 2002).

Existen muchos factores que pueden influir directamente sobre la calidad y conservación del semen porcino, dentro de ellos, uno de los más importantes es la contaminación por microorganismos (García *et al.*, 1998). Esta contaminación ocurre habitualmente durante el proceso de la extracción (Arauz *et al.*, 2000) o puede provenir del aparato génito-urinario del semental, la cual puede ocasionar una disminución de la fertilidad (Serrano *et al.*, 1994; Conza *et al.*, 2004).

II. MARCO METODOLÓGICO

La fase experimental se realizó en una instalación convencional abierta, ubicada en el Centro de Investigación Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el corregimiento de Chiriquí, Panamá; localizado a 8°23'15.12" latitud norte y 82°19'47.48" longitud oeste, y con una elevación de 26 msnm.

Se utilizó un verraco adulto de la raza Pietrain con un peso promedio de 295 Kg (3 años aproximadamente) con el objetivo de comparar la capacidad conservante del semen porcino de un diluyente comercial versus un diluyente convencional.

Se realizaron 4 colectas de semen con un intervalo de 6 días de descanso entre cada colecta. La extracción de semen se realizó en horas de la mañana (8:00-9:00 a.m.). Los tratamientos fueron: Dcom) Diluyente comercial de larga duración; DCon) Diluyente convencional compuesto de (37 g de glucosa, 6.0 g de citrato de sodio, 1.25 g de EDTA, 1.25 de bicarbonato de sodio, y 0.75 de cloruro de potasio/litro de agua destilada).

La porción espermática y post espermática del eyaculado fue colectada en una bolsa con filtro, y colocado en un baño maría con temperatura de 38°C para su posterior análisis. Adicionalmente, los diluyentes se prepararon y se colocaron en un baño maría a 38°C, buscando así la misma temperatura del semen como para el diluyente.

El volumen seminal se determinó con la ayuda de una balanza digital. El semen posterior a su colecta fue pesado y se registró el volumen obtenido.

La motilidad individual (MI%) fue evaluada subjetivamente donde se colocó 10 µl de semen sobre un portaobjeto atemperado a 37°C y se evaluaron los movimientos en masa utilizando un microscopio con aumento de 10x, y los movimientos individuales a un aumento de 40x, según la metodología descrita por Amann & Waberski (2014).

La concentración espermática se determinó mediante un fotómetro (Minitube, Germany).

El porcentaje de vivos (EV%) fue evaluado mediante la metodología de Kondracki *et al.* (2017) haciendo uso de una tinción basada en eosina y nigrosina.

El porcentaje de patologías espermáticas se determinó mediante la evaluación de anomalías morfológicas de la célula. Se realizó una dilución 1:100 de semen y formaldehído, se colocaron 10 μ l de semen sobre un portaobjeto y se enfocó en un microscopio con un aumento de 40x. Se realizaron conteos de 200 células y se clasificaron en células espermáticas con estructura morfológica correcta y células con anomalías morfológicas. Las células con anomalías morfológicas fueron subclasificadas en patologías primarias o secundarias según Zemjanis (1987).

Luego de la evaluación seminal inicial, el semen se diluyó a 3 billones de espermatozoides/ml como dosis final, manteniendo así la misma concentración espermática en todos los tratamientos. Se obtuvieron siete dosis seminales de 100 ml por cada tratamiento. El semen diluido se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas para posteriormente ser colocados en una nevera refrigerada a una temperatura ajustada a 16°C.

Evaluaciones de motilidad masal, individual y el porcentaje de vivos fueron nuevamente evaluados posterior a la dilución, dos horas post dilución, y cada 24 horas post refrigeración durante 7 días.

Los datos se ingresaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel® 2021 para su procesamiento. Los datos fueron sometidos a evaluación de los supuestos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk's, para valorar normalidad y Levene para homogeneidad de varianza. Se utilizó un diseño completamente al azar, y se utilizó el PROC ANOVA de SAS 9.3® para el análisis de varianza.

Estadísticamente, valores de $p < 0.05$ fueron considerados como diferencias, mientras que valores de $p < 0.10$ como una tendencia a diferir.

Tabla 1. Composición del diluyente convencional BTS.

Reactivos	(g L⁻¹)
C ₆ H ₁₂ O ₆	37
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	6.0
EDTA	1.25
NaHCO ₃	1.25
KCl	0.75

C₆H₁₂O₆: Glucosa; Na₃C₆H₅O₇: Citrato de sodio; EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; NaHCO₃: Bicarbonato de sodio; KCl: Cloruro de potasio.

El diluyente convencional BTS se realizó pesando los diferentes reactivos en un vaso químico sobre una balanza según el orden presentado en la (Tabla 1). Posterior a su pesaje se empieza a mezclar con la ayuda de un agitador magnético, agregándole agua destilada. Hasta que el soluto se haya diluido perfectamente con el solvente, se traspasa a un matraz aforado de 2 litros. Después de depositada la solución en el matraz aforado, se mezcla agitándolo manualmente hasta ver que se haya homogenizado en su totalidad. Posterior a su dilución, se almacena en un envase o recipiente lo más hermético posible, para luego ser refrigerado (16°C).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para el porcentaje de motilidad individual ($p < 0.05$, Tabla 2), mientras que en el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, numéricamente, EV% del DCom fue mayor que el DCon.

Tabla 2. Efectos de diferentes diluyentes sobre variables seminales en cerdos: promedio de la fase experimental.

Variables	Tratamientos		
	DCom	DCon	p -Trt
MI%	79.30 \pm 3.85	77.4 \pm 3.42	0.63
EV%	73.4 \pm 1.41	69.81 \pm 1.42	0.08

MI%: porcentaje de motilidad individual; EV%: porcentaje de espermatozoides vivos; DCom: diluyente comercial; DCon: diluyente conveccional BTS.

Estudios realizados por Dubé *et al.* (2004) y Vyt *et al.* (2004) encontraron diferencias en la MI% entre diluyentes de larga y media duración. La pérdida de la motilidad se debe a diferentes factores, principalmente a la duración del periodo de conservación. Hernández *et al.* (2004) observaron una reducción del 7% de la motilidad cada 24 horas en el medio D16. Mientras que Kommisrud *et al.* (2002) encontraron similares resultados en cuanto a motilidad individual con un semen conservado por 5 días en el medio BTS.

Dado que los diluyentes incluyen glucosa entre sus componentes, y debido a que la temperatura de almacenamiento de las dosis seminales es de 16° - 17°C, esto facilita el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas incluyendo *E. coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas*, la contaminación bacteriana conlleva una serie de alteraciones que incluyen una disminución de la motilidad espermática, aglutinación espermática y un aumento de la proporción de acrosomas (Althouse *et al.*, 2000). Colenbrander *et al.* (1993) indica que la adición

de una adecuada concentración de antibióticos mejora la supervivencia espermática además de mejorar los resultados de fertilidad.

La pérdida de adenosín trifosfato (ATP) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc), así como la reducción de la entrada de calcio, que conllevan a la pérdida motilidad (Johnson *et al.*, 2000). Por otra parte, otras investigaciones realizadas por Córdova-Izquierdo (2020) y Rodríguez (2005), respaldan que para que un eyaculado sea considerado normal, la motilidad espermática no debe ser menor 70%. Así también, Barth & Oko (1989) afirman que no debe existir más de un 30% de anomalías morfológicas en los recuentos efectuados. En resumen, los resultados para la variable de porcentaje de motilidad espermática obtenidos en esta investigación (Tabla 2), se encuentran dentro del rango establecido para la dilución del semen, presentando una diferencia de 1.9% mayor para la MI% del DCom. Adicionalmente, la diferencia obtenida para EV% fue de 3.59%, mayor para el DCom y de 3.23% menor para el DCon.

Con relación a la comparativa por días, se encontraron diferencias para el porcentaje de motilidad individual entre tratamiento, con una mayor disminución en la motilidad de los espermatozoides del tratamiento BTS ($p < 0.05$, Tabla 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias para el porcentaje de vivos. ($p > 0.05$).

Tabla 3. Efectos de diferentes diluyentes sobre las diferencias entre los días de muestreo.

	Variable	Días				P. value
		0	1	2	3	
TC	MI	94.63 ± 2.13a	94.5 ± 0.98a	78.25 ± 6.89b	71.88 ± 7.57b	0.0039
	EV%	78.35 ± 2.69	75.4 ± 2.25	71.96 ± 3.57	71.38 ± 2.87	0.3294
BTS	MI	93.5 ± 1.15a	90.75 ± 0.97b	83.25 ± 1.60c	72.625 ± 2.52d	0.0001
	EV%	70.79 ± 2.41	70.18 ± 3.1	69.74 ± 5.53	69.60 ± 2.69	0.9950

MI%: motilidad individual; EV%: espermatozoides vivos.

Según el estudio realizado por Vyt *et al.* (2004), se observó una disminución significativa en la MI% del semen con cinco diluyentes diferentes, pero en dicha investigación, hubo una mayor motilidad en cuanto al semen diluido con BTS que con un diluyente a largo plazo. Esto contrasta con otros estudios, donde el semen diluido con BTS mostró una menor MI% en comparación con los espermatozoides comparados con un diluyente comercial de largo plazo (Huo *et al.*, 2002; Kommisrud *et al.*, 2002; Dubé *et al.*, 2004). En nuestra investigación se observó una marcada reducción en el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides, con relación al intervalo entre días analizados para los diluyentes estudiados.

Estudios realizados por Huo *et al.* (2002), Kommisrud *et al.* (2002) y Dubé *et al.* (2004) cometen que la ausencia de diferencias entre los diluyentes estudiados indica que el plazo máximo de utilización de muestras en las condiciones productivas es de 3 días, donde el diluyente comercial no mostró mayor capacidad para mantener la viabilidad espermática por mayor tiempo.

En todos los parámetros evaluados y para todos los diluyentes, la mayor disminución en los valores se produjo en el primer día de conservación. Este resultado es consistente con lo expresado por Kumaresan *et al.* (2009); contrario a esto, el estudio de De Ambrogi *et al.* (2006), relató el mayor descenso de motilidad a las 72 horas.

El MI% muestra una marcada diferencia significativa en comparación con EV%, el cual no defirió. La MI% muestra una disminución desde el día de colecta (día 0), hasta el último día de viabilidad de utilización (día 3). Resultados reportados por Hernández (2009), Moraes y Moreira (1995), Valença y Guerra (2007), quienes plantearon que el descenso gradual de la calidad espermática con relación al tiempo de conservación se debe posiblemente al efecto de peroxidación que ocurre en los espermatozoides. Por ello, en el presente estudio solo se conservó semen porcino diluido BTS por un periodo de 72 horas.

El estrés oxidativo de los espermatozoides según estudios de Chihuailaf *et al.* (2002), Venéreo (2002) y Olgúin *et al.* (2004), es un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la

capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas.

Los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo y particularmente en la peroxidación lipídica (LOP) debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la membrana plasmática (Venéreo, 2002). Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos perjudiciales por la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual provoca acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis (Hicks *et al.*, 2006).

Cuando se produce la peroxidación lipídica (LOP) se pierde el 60% de los ácidos grasos de membrana (Jones *et al.*, 1979), lo que conlleva a la pérdida de la integridad de esta, alterándose la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica de la membrana, produciéndose finalmente la muerte celular.

La temperatura afectó negativamente las características seminales de los porcinos (Fuentes *et al.*, 1992). Según Colembrader y Kemp (1990), la producción espermática del verraco es afectada a partir de 29°C originando descenso en la motilidad espermática y un incremento en el número de espermatozoides con anomalías morfológicas; y son observadas cuando los verracos son expuestos a estrés por calor y cuando son sometidos a 35°C por 100 horas (Colembrader & Kemp, 1990).

Las altas temperaturas ambientales disminuyen la producción y motilidad espermática, y provocan un incremento en el número de espermatozoides anormales (Larsson y Einarsson, 1984). Las variaciones de 1 o 2°C de temperatura provocan afectaciones a los espermatozoides del semen porcino, ya que son particularmente sensibles a los cambios térmicos; siendo así necesario su refrigeración a 17°C. Cambios en la temperatura pudieron ser los causantes de que la motilidad de los espermatozoides se haya reducido a una vida útil de 3 días, por lo cual es de suma importancia el cuidado de la temperatura al momento de su colección, dilución, refrigeración y en la post refrigeración.

Al tomar las muestras de semen del verraco, estaba sometido a alto estrés calórico propio de las temperaturas de nuestro clima tropical y el mismo estrés de la extracción en sí de la manipulación humana, influyendo grandemente en la gran mortalidad de los espermatozoides.

Tabla 4. Componentes del diluyente BTS y sus costos.

Reactivo	Cantidad	Costo
Glucosa	74 g	B/. 0.53
Citrato de sodio	12 g	B/.0.12
EDTA	2.50 g	B/.0.62
Bicarbonato de sodio	2.50 g	B/.0.01
Cloruro de potasio	1.5 g	B/.0.15
Envases	20	B/.0.80
Total		B/. 2.23 / 20 dosis = B/. 0.11

Componentes del diluyente convencional BTS con sus cantidades, en el cual se puede apreciar el costo por dilución y de manera individual.

El diluyente convencional BTS es mundialmente utilizado, por su aporte de potasio, permitiendo mantener la actividad de la bomba sodio-potasio; evitando así la reducción del potasio intracelular, asociado con la reducción de la motilidad espermática (Rueda, 2011). También cuenta con la adición de un agente quelante (EDTA), el cual permite bloquear la acción del calcio, mejorando los procesos de capacitación y reacción cromosómica. Su preparación asegura que los productos utilizados son de calidad y la cantidad correcta, como también su rentabilidad en cuanto al costo/beneficio para pequeños y grandes productores. Existiendo una diferencia de B/. 0.59 por dosis, cabe destacar que, por lo general en explotaciones grandes, se insemina en promedio 20 cerdas diarias, lo que representa un costo diario de B/.11.80 y por mes de B/. 354.00. Dinero que puede ser invertido para cubrir otras necesidades de la explotación y hacerla aún más rentable. El diluyente BTS también es ventajoso ya que, al ser un diluyente de corta duración le es funcional a un pequeño productor, de modo que, si no es necesario su conservación

por más de cuatro días, lo más conveniente sería la utilización de un diluyente de corta duración, por su bajo costo, fácil preparación y su ofrecimiento de resultados similares a los diluyentes de larga duración.

IV. CONCLUSIONES

La utilización de diluyentes convencionales pueden mantener las características seminales de manera similar que diluyentes comerciales, hasta tres días post colecta, en nuestras condiciones.

El diluyente convencional se vio afectado por diversos factores como temperatura, estación del año y contaminación bacteriana, los cuales fueron determinantes en la viabilidad de este.

V. RECOMENDACIONES

- Se les debe brindar alimentos que satisfagan los requerimientos nutricionales de los verracos, para así obtener mayores beneficios productivos y reproductivos.
- Incentivar el uso de técnicas adecuadas para evitar la contaminación del eyaculado por agentes patógenos presentes en el medio.
- Seguir los estudios de diluyentes convencionales con la adición de antibióticos, para reducir la presencia de microorganismos en las muestras pasados los 4 días.
- Compartir los resultados obtenidos del potencial reproductivo del semen porcino a pequeños y medianos productores, técnicos y estudiantes.
- Se recomienda a los productores utilizar el diluyente convencional, ya que en costo/beneficio le es rentable en grandes explotaciones.
- Es necesario que en Panamá se promueva la investigación científica tomando las condiciones reales que afectan nuestro país, para lograr mejoras sustanciales en el material genético obtenido dado que, la imitación no resuelve el problema porque nuestras condiciones ambientales son diferentes al resto de Latinoamérica.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M., Ruedas, M., Arias, T., Paez, R., Espinosa, I., Martinez, V. & Perdigón, R. (2011). Evaluación de la contaminación bacteriana de semen porcino puro y diluido. *Livestock Research for Rural Development*, 23(4), 80. <http://www.lrrd.org/lrrd23/4/acosta23080.htm>
- Alamo, D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la Especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152° C. [Trabajo de grado, *Universidad Central del Ecuador*]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12701/1/T-UCE-0014-062-2014.pdf>
- Alemán, D., Mayra, A., & Hurtado, E. (2007). Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas. *Zootecnia tropical*, 25(2), 71–75. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692007000200002
- Althouse, G., Kuster, C., Clark, S. & Weisiger, R. (2000). Investigaciones de campo de contaminantes bacterianos y sus efectos en semen porcino extendido. *Theriogenology*, 53 (5), 1167 – 1176. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00261-2)
- Althouse, G., Wilson, M., Kuster, C. & Parsley, M. (1998). Caracterización de bajas temperaturas y limitantes en la recolección del semen fresco porcino. *Theriogenology*, 50, 535 - 543. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00159-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00159-9)
- Álvarez, J. & Storey, B. (1982). Peroxidación lipídica espontánea en espermatozoides epididimarios de conejo: su efecto sobre la motilidad de los espermatozoides. *Biology Reproduction*, 27, 1102 - 1108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1102>
- Amann, R. & Waberski, D. (2014). Análisis de esperma asistido por computadora (AEAC): capacidades y desarrollos potenciales. *Theriogenology*, 81(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.004>

- Aragon, H. (1987). Anatomía y Fisiología Comparada del Cerdo, Gallina y Conejo. *Centro Latinoamericano de Especies Menores (CLEM)*, https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4080/anatomia_fisiologia_co?sequence=1
- Arauz, S., Stomelli, A. & Williams, S. (2000). Estudio bacteriológico del semen porcino puro y diluido. *Sitio Porcino de Producción Animal*. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-reproduccion_IA_porcinas/32-Evaluacion_contaminacion_bacteriana.pdf
- Arbaiza, M. (2020). Efecto de la criopreservación en fragmentación del ADN, viabilidad, motilidad y cinética espermática en toros brown swiss empleando el sistema casa. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4297/arbaiza-barnechea-martin-daniel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Arisnabarreta, E. & Allende, R. (2017). Manual de inseminación artificial en porcinos. *Editorial Taurus, Buenos Aires*, 8 - 13, 27 - 30, 69, 80 - 84. <https://cenida.una.edu.ni/textos/NL10U58.pdf>
- Barth, A. (2000). Evaluación de la solidez reproductiva del toro. *Western Canadian Association of Bovine Practitioners*, 11(2), 49-59. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5178282.pdf>
- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa (1st ed). *Iowa State University Press*.
- Bin, H., Huiduo, G., Yabin, G., y Ruqian, Z. (2017). Lipopolysaccharide-induced mitochondrial dysfunction in boar sperm is mediated by activation of oxidative phosphorylation. *Theriogenology*, 87, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.030>
- Blom, E. (1983). Pathological conditions in genital organs and sperm as a cause for the rejection of breeding bulls for import into and export from Denmark. *Nord Vet Med*, 35(3), 105 – 30. <https://europepmc.org/article/med/6878032>
- Cameron, R. & Vickers A. (1986). Características seminales de verracos recolectados tres veces por semana en un periodo inferior a 48 horas. *Pig Vet*, 62(9), 4-301. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4074216/>

- Chenoweth, P & Kastelic, J. (1997). Anatomía clínica reproductiva y fisiología del toro. *Theriogenology*, 1, 221-228.
https://www.researchgate.net/publication/289730697_Clinical_Reproductive_Physiology_and_Endocrinology_of_Bulls
- Chihuailaf, R., Contreras, P. & Wittwer, F. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, 33, 3.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2002/vm023f.pdf>
- Colenbrander, B. & Kemp, B. (1990). Factores que influyen en la calidad del semen en cerdos. *Journal of Reproduction and Fertility Lid*, 40, 105 - 115.
<https://www.bioscioproceedings.org/bp/0013/pdf/bp0013cpr8.pdf>
- Conza, L., Calle, S., Echevarría, L., Falcón, N. & Cerón, M. (2004). Evaluación bacteriológica de semen de verracos usados como reproductores en granjas porcinas de la zona de Lurín, Lima. *Revista Investigaciones Veterinarias Perú*, 15 (2), 163 - 165.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172004000200012
- Cooper, W. (1980). Crianza artificial de caballos. *The Veterinary Clinics of North America*, 2 (2), 267 - 275.
- Coraza, L., Bouza, R. & Petrocelli, H. (1990). Inseminación Artificial en cerdos. *Montevideo, Uruguay*, 17.
- Córdova-Izquierdo, A. (2020). Puntos a tomar en cuenta en la valoración práctica fenotípica de la capacidad reproductiva del verraco. *Porcicultura*.
<https://www.porcicultura.com/destacado/Puntos-a-tomar-en-cuenta-en-lavaloracion-practica-fenotipica-de-la-capacidad-reproductiva-del-verraco>
- Córdova, I. (2017). Biotecnología de la reproducción en la especie porcina: papel de la crio preservación espermática. *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco*, 11 - 20.
https://www.amvec.com/memories/memorias/2003/2003_086.pdf
- Cuéllar, J. (2020). Las técnicas de asistencia reproductiva como la Inseminación Artificial (IA) han mejorado los índices productivos notablemente en las granjas porcinas en años recientes. *Veterinaria Digital*.

<https://www.veterinariadigital.com/articulos/inseminacion-artificial-porcina-reproduccion-eficiente/>

- Cuenca, M. & Avellaneda, J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *REDVET*, 18 (9), 1 - 11. https://www.researchgate.net/profile/Mercy-Cuenca/publication/342623881_ARTICULO__DILUYENTES_REDVET/links/5e6d7dbb4585155050849745/ARTICULO-DILUYENTES-REDVET.pdf
- De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M. & Rodriguez, H. (2006). Efecto del almacenamiento en diluyentes de semen comerciales de corto y largo plazo sobre la motilidad, la membrana plasmática y la integridad de la cromatina de los espermatozoides porcinos. *Int Journal Andrology*, 29, 543 - 552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00694.x>
- Del Toro, Y., Arias, T. & Cambo, E. (1986). La explotación de sementales porcinos y su calidad espermática. *Asociación Cubana de Producción Animal*, 4, 31-36.
- Díaz, G., Marsán, V., Fernández, N., Román, T., Lam, R., Rodríguez, C. & Muñoz, L. (2017). Diagnóstico por citometría de flujo de la hemoglobinuria paroxística nocturna. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, 36. <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/download/719/567>
- Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes, C., Guillemette, C. & Bailey, J. (2004). Capacidad de almacenamiento de espermatozoides de verraco de BTS y Androhep Plus: viabilidad, motilidad, capacitación y fosforilación de tirosina. *Theriogenology*, 62(5), 874-886. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15251239/>
- Frenette, G. & Sullivan, R. (2001). Las partículas similares a prostasome están involucradas en la transferencia de P25b desde el líquido del epidídimo bovino a la superficie del espermatozoide. *Mol Reproduc Dev*, 59(1), 115 - 121. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11335953/>
- Frunza, I., Cernescu, H. & Korodi, G. (2008). Parámetros físicos y químicos del semen de verraco. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinaria*, 41. https://usab-tm.ro/vol8MV/101_vol8.pdf
- Fuentes, A., De Serrano, G., Manzo, M., Regueiro, C. & Valle, A. (1992). "Effect of season on semen traits of boar in the tropica". *Zootecnia Tropical*, 1, 51- 64.

- Gadea, J. (2003). Los diluyentes de inseminación artificial porcina. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17 - 27. <https://www.um.es/grupo-fisiovet/Gadea%202003%20SJAR.pdf>
- Gadea, J. (2005). Factores espermáticos relacionados con la fertilidad porcina in vitro e in vivo. *Theriogenology*, 63, 431-444. <https://www.um.es/grupo-fisiovet/Gadea2005theriogenology.pdf>
- Galina, C. & Valencia, J. (2009). Reproducción de animales domésticos. *Limusa*, 3, 582.
https://www.academia.edu/44103306/Reproducci%C3%B3n_de_Los_Animales_Dom%C3%A9sticos_C_galina_y_J_Valencia
- García, J., La Puente, D., Corcuera, A. & Rillo, M. (1998). Importancia de los resultados de fertilidad Memorias del V Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial en Porcinos.
- Gómez, C., Mozo, R. & Cabrejas, S. (2008). Diluyentes de refrigeración para semen porcino. *Mundo ganadero*, 40-41.
https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_mg/mg_2008_206_40_41.pdf
- González, K. (2018). Inseminación Artificial en Cerdos. *La porcicultura*.
<https://laporcicultura.com/reproduccion-porcina/inseminacion-artificial-cerdos/>
- Hafez, E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. *Interamericana-McGaw-Hill*, 6 (18), 542.
- Hernández, J. (2009). Evaluación de un nuevo diluyente para semen porcino. *Revista electrónica de Veterinaria*, 10 (4), 2.
- Hernández, J. (2009). Evaluación de un nuevo diluyente para semen porcino. *RedVet*, 10 (4), 1-11. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63611961005.pdf>
- Hernández, J. & Cruz, R. (2004). Influencia del tiempo de conservación, raza, volumen y concentración sobre la motilidad del semen fresco porcino almacenado por 96h. *Revista de Reproducción Animal*, 30(1-2), 75-80.
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63611961005.pdf>
- Hicks, J., Torres, R. & Sierra, V. (2006). Estrés oxidativo. *Endocrinología y Nutrición*, 4, 223 – 226.

- Hidalgo, D. (2013). Fisiología Celular y Calidad Seminal Durante la Conservación del Semen Porcino Refrigerado. *Universidad de Extremadura*. https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/799/1/TDUEX_2013_Martin_Hidalgo.pdf
- Huo, L., Ma, X. & Yang Z. (2002). Evaluación de la viabilidad del espermatozoide, la actividad mitocondrial, la capacitación y la integridad del acrosoma en semen de verraco prolongado durante el almacenamiento a largo plazo. *Theriogenology*, 58, 1349 – 1360. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12387348/>
- Johnson, L., Aalbers, J. & Groote, H. (1988). Inseminación artificial de cerdos: Fecundidad del semen de verraco almacenado en Beltsville Thawing Solution (BTS), Módena modificada (MM) o MR-A e inseminado uno, tres y cuatro días después de la recolección. *Zuchthyg*, 23, 49 - 55. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1988.tb01080.x>
- Johnson, L., Weitze, K., Fiser, P. & Maxwell, W. (2000). Almacenamiento del semen porcino. *Animal Reproduction Science*, 62, 143–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Jones, R., Mann, T. & Sherins, R. (1979). Descomposición peroxidativa de fosfolípidos en espermatozoides humanos, propiedades espermicidas del peróxido de ácidos grasos y acción protectora del plasma seminal. *Fertility and sterility*, 31(5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)43999-3)
- King, G. & Macpherson, J. (2005). Actividad de fosfatasa alcalina y ácida, pH y presión osmótica del semen de verraco. *Comp Med Vet*, 30, 304 - 307. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1494602/pdf/vetsci00024-0013.pdf>
- Kirchhoff, C. & Hale, G. (1996). Transferencia de célula a célula de glicosilfosfatidilinositolancladas proteínas de membrana durante la maduración de los espermatozoides. *Mol Hum Reprod*, 2, 177 - 184. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9238677/>
- Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E. & Greble, I. (2002). Influencia de los parámetros del verraco y del semen sobre la motilidad y la integridad acrosómica

- en almacenes líquidos de semen por cinco días. *Acta veterinaria Scandinavica*, 43(1), 49–55. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-49>
- Kubus S.A. (2011). Inseminación artificial porcina: como ganar eficiencia con la reproducción de tu ganado porcino. *Mainzer Producción Gráfica*, 3, 122. <https://prokcsmmedia.blob.core.windows.net/sys-master-images/h17/ha0/9174574563358/KUBUS-2014-CATALOGO.pdf>
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K., Bardoloi, R., Das, A., Kumar, S. & Naskar, S. (2009). Preservación del semen del verraco a 18°C induce peroxidación lipídica y apoptosis, como cambios en el espermatozoide. *Animal Reproduction Science*, 110(1-2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.006>
- Kuster, C. & Althouse, G. (1999). La fecundidad del semen porcino almacenado por 2 a 6 días in Androhep y X-CELL extendido. *Theriogenology*, 52(3), 365 – 376. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00135-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00135-1)
- Larsson, K. & Einarsson, S. (1984). Seminal Changes in boars after heat stress. *Acta Vet Scand*, 25, 57 – 66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6464925/>
- Madrid, N. (2004). Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro and la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. *Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid*, 164.
- MAGAPOR. (2019). Consejos para una correcta dilución II. *Magapor SL*. <https://magapor.com/sala-prensa/consejos-para-una-correcta-dilucion-i/>
- Marchesi, M. & Cesarini, F. (2012). Efecto de la nutrición en la calidad del semen porcino. *IPVS*.
- Martín, D., Barón, F., Robina, A., Bragado, M., Hurtado de Llera, A., García, L. & Gil, M. (2013). Estudio comparativo inter e intraraza de la motilidad y viabilidad espermática en semen de verraco ibérico y Duroc durante el almacenamiento a largo plazo en diluyentes MR-A y XCell. *Animal Reprod Sci*, 139, 109 - 114.
- Martín, S., Gábor, Á., Karin, M., Ralf, B., Markus, J. & Ulrike, J. (2019). Antibacterial defense and sperm quality in boar ejaculates. *Journal of Reproductive Immunology*, 131, 13 - 20. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.11.001>

- Martín, S., Shokouhi, V., García, E., Hernández, R. & Romero, L. (1998). Contaminación de dosis de semen y su posible relación con la flora bacteriana del prepucio. *International Pig Veterinary Society Congress*, 3, 60.
- Martínez, R. (2002). Aspectos prácticos de higiene en la inseminación artificial. *Los porcicultores y su entorno*, 28, 25 – 34.
- Mazzarri, G., Fuentes, A. & Valle, A. (1986). Frecuencia de recolección de semen en verracos y su relación con la fertilidad. *Zootecnia trop*, 4(1-2), 79 - 88.
- Moraes, G. & Moreira, I. (1995). Diluyentes en la conservación del semen porcino en frío. Reunión Anual de la Sociedad Brasileña de Ciencia Animal. 2, 450 - 451.
- Ochoa, G., Acosta, M., Rueda, M. & Ortega, R. (2008). Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. Pruebas in vitro/Conservation of pig semen. *Revista computarizada de Producción Porcina*, 15, 298. http://www.iip.co.cu/R CPP/153/153_10artGOchoaB.pdf.
- Olguín, C., Guiller, G., Zúñiga, R. & Pasqueti, P. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Endocrinología y Nutrición*, 12(4), 199–206. <https://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2004/er044d.pdf>
- Pérez, F. (1990). Reproducción Animal, Inseminación Artificial y Trasplante de embriones. Pérez, J (ed). *Científico Médica*. (Original publicado en 1985).
- Pinto, M., Ramalho, S., Perestrelo, R. & Rodrigues, J. (2000). Perfil microbiológico del semen puro y dosis seminales de verracos utilizados en inseminación artificial. *Veterinaria Técnica*, 10(3), 24 – 28.
- Pruneda, A., Pinart, E., Briz, M. D., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Kadar, E., Bassols, J., Bussalleu, E., Yeste, M., & Bonet., S. (2005). Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, 63, 2219–2232. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.009>
- Pursel, V. & Johnson, L. (1975). Congelación de espermatozoides de verraco: capacidad fecundante con semen concentrado y un nuevo procedimiento de descongelación. *Journal Animal Science*, 40, 99 - 102. https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/799/1/TDU EX_2013_Martin_Hidalgo.pdf

- Ramírez, A., Aguilar, S., Córdova A. & Méndez, M. (2000). Evaluación y producción de semen de cerdo Pelón mexicano. *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco*.
- Rocha, G., Castañeda, J. & Valencia, J. (2005). Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9(3), 33-43.
<https://www.redalyc.org/pdf/837/83790304.pdf>
- Rodríguez, H. (2005). Evaluación de la calidad seminal en el verraco. *Avances en tecnología porcina*, 2(7-8).
<https://www.avparagon.com/docs/reproduccion/ponencias/21.pdf>
- Rueda, M. (2011). Diluyentes para la conservación de semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 19-26.
http://www.iip.co.cu/R CPP/181/181_02artresMRueda.pdf
- Rueda, M. & Ortega, R. (2008). Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración: pruebas in vitro. *Instituto de Investigaciones Porcinas*.
- Rueda, M., Perdigón, R., Arias, T., Mendoza, D., Benítez, J. & Lemus S. (2009). Diluyentes Cubanos de semen porcino. *Producción Porcina*. 26-29.
http://www.iip.co.cu/R CPP/161/161_03artMRueda.pdf
- Rugeles, C., Caicedo, R., Almentero, C., Linares, J. & Vergara Garay, O. (2013). Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. *Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia*, 23(3).
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15795>
- Sánchez, K. (2019). Calidad del Semen a 5°C y su Efecto en la Fertilidad y Tamaño de Camada de Cerdas en el Trópico de Guerrero México. *Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo*.
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/DGB_UMICH/6610/1/IAF-M-2019-0474.pdf
- Serrano, M., Pérez, M., Miguel, J. & Milán, J. (1994). Estudio de las anomalías espermáticas de los verracos en relación la raza, tipo y época. *Anaporc*, 139, 40-57.

- Strickland, L. & Dact, D. (2000). Evaluación completa de la solidez reproductiva ¿Están sus toros aptos para el servicio?. *Theriogenology*. <https://www.therio.org/search/all.asp?c=&bst=solidez+reproductiva>
- Strzezek, J. (2000). Efecto de las pruebas de agotamiento (PA) en la composición del semen porcino. *Theriogenology*, 54, 949-963. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00404-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00404-0)
- Tardif, S. (1999). La importancia de los parámetros espermáticos porcinos en la fertilidad in vitro. *Theriogenology*, 52, 447-459. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00142-9)
- Trudeau, V. & Sanford, L. (1986). Efecto de la estación y el entorno social sobre el tamaño de los testículos y la calidad del semen del verraco adulto de landrace. *Journal of Animal Science*, 63, 1211-1219. DOI: 10.2527/jas1986.6341211x
- Trujillo, O., Contreras, O., Espinosa, H., Gutiérrez, P., Hernández, T., Nava, N., Martínez, G., Martínez, R., Rojas, C., Sánchez, H., Viguera, V. & Castellanos, S. (2017). *El verraco. Universidad Nacional Autónoma de México. 1*. <https://doi.org/10.22201/fmvz.9786070290633e.2017>
- Valença, R. & Guerra, M. (2007). Especies reactivas de oxígeno (ROS) y uso de antioxidantes en la criopreservación de semen porcino. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 31, 47 - 53.
- Valencia, C. (2006). Elaboración de diluyentes de semen porcino. *BibDigital*. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
- Venéreo, G. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Med Milit*, 31, 126 – 133.
- Villa, P. (2015). Evaluación de semen porcino sometido a la dilución en dos etapas térmicas y su efecto reproductivo sobre la inseminación artificial en cerdos. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/5193/1/17T1278.pdf>
- Vyt, P., Maes, D., Dejonckheere, E., Castryck, F. & Van Soom, A. (2004). Estudio comparativo de cinco diluyentes comerciales diferentes para semen porcino. *Reprod Domest Anim*, 39, 8 - 12.

- Weitze, K. (2000). Infertilidad estacional en el cerdo. *Universida de Federal do Rio Grande do Sul*, 50 - 55.
- Williams, S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *Belo Horizonte*, 37(2), 207-212.
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/DGB_UMICH/6610/1/IAF-M-2019-0474.pdf
- Yeste, M. (2017). Estado del arte en conservación de esperma de verraco en estado líquido y congelado. *Animal Reproduction*, 14(1), 69-81.
<http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>
- Zemjanis, R. (1987). Reproducción Animal. *Diagnósticos y técnicas terapéuticas*. Pacheco, D. (trad). 13, 253. (Original publicado en 1966).

VII. ANEXOS

Anexo 1. Evaluación seminal en el laboratorio.



Anexo 2. Evaluación de motilidad y porcentaje de vivos y muertos.



Anexo 3. Evaluación de dosis seminales

