

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



**“EFECTO DEL pH DE UN EXTENSOR DE SEMEN  
PORCINO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA”**

JUAN ALEJANDRO OLIVA TREJO

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**“EFECTO DEL pH DE UN EXTENSOR DE SEMEN PORCINO  
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA”**

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD  
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR:

JUAN ALEJANDRO OLIVA TREJO

COMO REQUISITO, PREVIO A OPTAR AL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2004

## **JUNTA DIRECTIVA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS GUATEMALA

DECANO: DR. M.V. MARIO LLERENA QUAN

SECRETARIA: DRA. M.V. BEATRIZ SANTIZO

VOCAL I: DR. M.V. YERI VELIZ PORRAS

VOCAL II: DR. M.V. FREDY GONZÁLEZ

VOCAL III: DR. M.V. EDGAR BAILEY

VOCAL IV: BR. ESTUARDO RUANO

VOCAL V: BR. DANIEL BARRIOS

## **ASESORES**

DR. M.V. YERI VELIZ PORRAS

DRA. M.V. LIGIA ANAITÉ GONZÁLEZ

DR. M.V. CARLOS ENRIQUE CAMEY

**HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**“EFECTO DEL pH DE UN EXTENSOR DE SEMEN PORCINO  
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA”**

Aprobado por la Junta Directiva, previo a optar al título profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO**

## **ACTO QUE DEDICO**

A Dios mi Padre por su infinito amor que expresa en todo momento de mi vida y por estar siempre conmigo.

A Juan Guillermo Oliva Carrera, al guerrero, académico, artista y amoroso padre, que siempre cumple con sus promesas.

A Nora Patricia Trejo de Oliva, por ser una excelente madre, por su esfuerzo y entrega, para sus hijos y su familia.

A Juan Guillermo, Juan Pablo, Gabriela Patricia y Andrea Patricia, por su fraternidad.

A Dora viuda de Oliva y Ester Monroy, por su guía y cariño de abuelita.

A todos los miembros de mi familia.

A Lilly Mariel Urizar mi mejor amiga y a su familia.

A mis amigos y compañeros de promoción.

A las personas santas y sabias, cuya vida me inspira para ser mejor cada día, incluyendo a Paramahansa Yogananda.

A Lytton Grignon.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, profesores y personal.

A todas las criaturas de Dios, y especialmente aquellas a quienes les debo el aprendizaje directo durante mi carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mis asesores Dr. Yeri Veliz, Dra. Ligia González y Dr. Carlos Camey, por su apoyo y su guía en la realización de esta investigación.
- Al Licenciado Álvaro Díaz, y al personal técnico de la granja experimental de cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su ayuda durante la etapa experimental del estudio.
- Al Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por facilitar sus instalaciones y material.
- A las personas que contribuyeron de alguna forma en la realización de este estudio, especialmente a Juan Guillermo Oliva Carrera, Gabriela Patricia Oliva y Misako Yamaguch

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
	3.1 General	3
	3.2 Específicos	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
	4.1 Antecedentes	4
	4.2 Inseminación artificial	4
	4.3 Inseminación artificial en cerdas	4
	4.4 Técnica de inseminación artificial en cerdos	5
	4.4.1 Colecta de semen	5
	4.4.2 Evaluación de la calidad espermática	6
	4.4.2.1 Evaluación macroscópica	7
	4.4.2.1.1 Volumen	7
	4.4.2.1.2 Temperatura	8
	4.4.2.1.3 pH	8
	4.4.2.1.4 Características organolépticas	9
	4.4.2.2 Evaluación microscópica	9
	4.4.2.2.1 Motilidad	9
	4.4.2.2.2 Concentración	10
	4.4.2.2.3 Aglutinaciones	11
	4.4.2.2.4 Proporción de vivos y muertos (Tinción supravital)	12
	4.4.2.2.5 Morfología espermática (Defectos o anomalías)	12
	4.4.2.3 Resumen de parámetros mínimos de calidad en eyaculado de verraco	13
	4.4.3 Preparación de dosis seminales	13
	4.4.3.1 Extensores de semen	14

4.4.3.1.1	Funciones del extensor	14
4.4.3.1.2	Aporte de nutrientes	14
4.4.3.1.3	Estabilización de la membrana	15
4.4.3.1.4	Regulación del pH	15
4.4.3.1.5	Control de la presión osmótica	15
4.4.3.1.6	Inhibición del crecimiento bacteriano	16
4.4.3.1.7	Tipos de extensores	16
4.4.3.1.8	Extensores de semen porcino agrupados de acuerdo a su duración	17
4.4.3.1.9	Elección del extensor	17
4.4.3.2	Extensor BTS	17
4.4.3.3	Cálculos para la preparación de dosis seminales	18
4.4.3.3.1	Fórmula para la determinación del número de dosis seminales que podemos elaborar	18
4.4.3.3.2	Fórmula para la determinación del volumen total	18
4.4.3.3.3	Fórmula para la determinación de la cantidad de extensor a utilizar	19
4.4.4	Inseminación de la hembra	19
4.4.4.1	Resumen del método manual de inseminación artificial utilizando catéter en espiral o tipo Melrose	19
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1	Materiales	20
5.1.1	Recursos humanos	20
5.1.2	De laboratorio	20
5.1.3	De campo	21
5.1.4	Biológicos	21
5.1.5	Centros de referencia	21
5.2	Métodos	21
5.2.1	Medición de las fluctuaciones de pH del extensor de semen	21
5.2.2	Preparación del primer extensor	22

5.2.3	Colecta de semen	22
5.2.4	Evaluación del eyaculado	22
5.2.5	Preparación del segundo extensor	22
5.2.6	Preparación de las dosis seminales	23
5.2.7	Evaluación del semen extendido	23
5.2.7.1	Motilidad General	23
5.2.7.2	Motilidad Individual	23
5.2.7.3	Aglutinaciones	24
5.2.7.4	Determinación de vivos y muertos	24
5.2.8	Conservación de las dosis seminales	24
5.2.9	Tratamientos	24
5.2.10	Unidad experimental	25
5.3	Análisis estadístico	25
5.3.1	Motilidad general	25
5.3.2	Motilidad individual	25
5.3.3	Aglutinaciones	25
5.3.4	Determinación de vivos y muertos	26
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1	Medición de las fluctuaciones de pH del extensor de semen	27
6.2	Motilidad General	28
6.3	Motilidad Individual	28
6.4	Aglutinaciones	29
6.5	Determinación de vivos y muertos	29
6.6	Calidad espermática	29
6.6.1	Regulación de pH en el semen	30
6.6.2	Rango aceptable de pH de semen de verraco	30
6.6.3	Cambios de pH observados	31
VII.	CONCLUSIONES	32
VIII.	RECOMENDACIONES	33
IX.	RESUMEN	34
X.	BIBLIOGRAFÍA	35

XI.	ANEXOS	37
11.1	Tabla de resultados de fluctuación de pH de los extensores	38
11.2	Boleta de resultados de laboratorio	39
11.3	Gráficas de motilidad general	40
11.4	Gráficas de motilidad individual	41
11.5	Gráficas de porcentaje de espermatozoides vivos (Determinación de vivos y muertos)	42

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro No. 1</b>	Resumen de parámetros mínimos de calidad en eyaculado	13
<b>Cuadro No. 2</b>	Extensores de semen porcino agrupados de acuerdo a su duración	17
<b>Cuadro No. 3</b>	Resultado de la medición de las fluctuaciones de pH del extensor de semen porcino comercial	27
<b>Cuadro No. 4</b>	Resultados de motilidad general	28
<b>Cuadro No. 5</b>	Resultados de motilidad individual	28
<b>Cuadro No. 6</b>	Resultados de aglutinaciones	29
<b>Cuadro No. 7</b>	Resultados de prueba de vivos y muertos	29

## I. INTRODUCCIÓN

Los primeros experimentos de inseminación artificial en animales domésticos cuentan con una historia registrada de más de 220 años. En cerdos se conocen estudios relacionados a la inseminación artificial desde inicios del siglo XX. Durante su constante evolución la técnica ha cambiado por completo la reproducción porcina y por ende, la porcicultura como actividad pecuaria.

La inseminación artificial en cerdos ha tomado una dirección diferente comparada con otras especies de producción. Cuenta con muchas ventajas sanitarias y zootécnicas cuando es utilizada de forma adecuada, al compararla con la monta natural. Las características intrínsecas del espermatozoide porcino no han permitido desarrollar hasta la fecha una técnica para conservación a largo plazo que tenga resultados satisfactorios. Es por esto que la gran mayoría de inseminaciones artificiales practicadas en cerdas alrededor del mundo, se hace con semen refrigerado el cual tiene una vida muy corta de almacenamiento.

La técnica actual para la inseminación artificial en cerdos, utiliza soluciones conocidas como extensores, que entre otras cualidades, aumenta el volumen seminal; protege, nutre y estabiliza el espermatozoide y su medio. Si bien es cierto que los extensores mejoran muchos aspectos de la reproducción natural, hay que señalar que no cumplen con ciertas cualidades deseables, especialmente la conservación a largo plazo.

Una característica muy interesante que presentan algunos extensores de semen porcino, es que estos tienden a sufrir variaciones de pH luego de su preparación y logran la estabilización hasta después de noventa minutos. Los espermatozoides estarían expuestos a serios daños debido a estas fluctuaciones, sin embargo en la práctica observamos preñez y nacimientos aún cuando la técnica, teóricamente está siendo mal utilizada.

En el siguiente estudio, se evaluó en el laboratorio, el efecto que tiene el pH de un extensor de semen porcino sobre la calidad espermática, comparando las pruebas de motilidad general, motilidad individual, la determinación de vivos y muertos y determinación de aglutinaciones.

## **II. HIPÓTESIS**

La calidad espermática no es afectada por los cambios de pH del extensor de semen porcino.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

- Contribuir al estudio de la inseminación artificial en la especie porcina.

#### **3.2 Específicos**

- Evaluar las fluctuaciones de pH de un extensor de semen porcino y su efecto sobre la calidad espermática utilizando un extensor de semen porcino con dos tiempos de preparación diferentes.
- Comparar la motilidad espermática individual y general, cuando se utiliza un extensor de semen porcino preparado inmediatamente con uno preparado dos horas antes de utilizarlo.
- Comparar la prueba de vivos y muertos, cuando se utiliza un extensor de semen porcino preparado inmediatamente con uno preparado dos horas antes de utilizarlo.
- Comparar el número de aglutinaciones, cuando se utiliza un extensor de semen porcino preparado inmediatamente con uno preparado dos horas antes de utilizarlo.

## **IV. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 Antecedentes**

En el año de 1999, Newth y Levis realizaron un experimento para evaluar los cambios en el pH de cinco extensores de semen. Determinaron que no todos los extensores de semen tiene el mismo patrón de cambio de pH a través del tiempo. Por lo que recomendaron extender el semen hasta que se haya alcanzado un pH estable, lo cual ocurre de 60 a 90 minutos después de preparar el extensor. (16)

Investigaciones realizadas en la Universidad del Norte de Carolina, indican que el pH de dos extensores de semen de verraco, necesitan por lo menos 60 minutos para que el pH alcance el equilibrio. Si los espermatozoides se les va a proveer un ambiente estable de pH al momento de dilución, el extensor debe ser preparado por lo menos, una hora antes de la utilización. (16)

Esta información sugiere que los extensores no cambian de pH uniformemente a través del tiempo.

### **4.2 Inseminación artificial**

Más de 100 años después de haberse visto y descrito por primera vez los espermatozoides con lentes de aumento en 1677, se documentaron los primeros experimentos relacionados con la inseminación artificial (IA) en animales. En 1780 el fisiólogo italiano Spallanzani, utilizó una jeringa para depositar semen a temperatura corporal dentro del útero de una perra con signos manifiestos de celo. El experimento de Spallanzani fue exitoso y dio origen a una técnica que hasta nuestros días está en continua evolución y mejoría. (4)

### **4.3 Inseminación artificial en cerdos**

La IA porcina fue iniciada por Ivanow en Rusia en los primeros años del siglo XX, posteriormente se desarrolló su uso y en los años siguientes se fue extendiendo a otros países. El verdadero desarrollo y la amplia aplicación a nivel comercial de la IA porcina se produce a partir de la década de los 80, cuando se estandarizan los protocolos de inseminación. (2,4)

En la actualidad, la IA porcina es una técnica reproductiva de amplia diseminación en todo el mundo, aunque el grado de utilización en los diversos países es muy variable. Las estimaciones

actuales indican que se realizan alrededor de 19 millones de inseminaciones en el mundo, y casi todas se realizan con semen refrigerado el día de la colecta o al día siguiente. (6, 14)

La técnica de IA en cerdos es ahora parte integral de área reproductiva de muchas explotaciones porcinas, incrementándose su popularidad debido a las innegables ventajas que presenta con respecto a la monta natural.

Entre las principales ventajas que obtenemos al utilizar la IA, tenemos:

- Mejoramiento genético por medio del uso de sementales de calidad comprobada.
- Reducción de las posibilidades de introducción de enfermedades a las explotaciones.
- Disminución en el número de sementales necesarios, aumentando el rendimiento reproductivo de estos.
- Reducción de los costos de manejo e instalaciones.
- Eficiencia en el manejo reproductivo (tiempo y trabajo).
- Mejor control de la calidad de semen. (14)

#### **4.4 Técnica de inseminación artificial en cerdos**

En cerdos la IA es relativamente sencilla comparada con otras especies. En términos generales el proceso de IA se puede resumir en las siguientes fases:

- Colecta de semen.
- Evaluación de la calidad espermática.
- Preparación de las dosis seminales.
- Inseminación de la hembra.

##### **4.4.1 Colecta de semen**

El éxito de la colecta de semen y la calidad del eyaculado va a estar influenciado por varios factores, como la preparación de material antes de entrar a la sala de colecta, la preparación del verraco, la técnica utilizada para obtener la muestra, etc. La muestra de semen se obtiene de un verraco entrenado para esta función, utilizando el método manual de fijación.

El material a utilizar durante todo este proceso debe estar estéril y a una temperatura de 37 °C. La sala destinada a la extracción de semen debe estar limpia antes de que entre el verraco. En la sala de extracción se encuentra el potro o maniquí, en posición fija para facilitar el proceso. Antes de empezar la extracción, se debe limpiar en seco toda el área alrededor del pene y prepucio. Una

vez el verraco monta el potro, se debe sostener firmemente el pene extrayéndolo en toda su longitud. Debe utilizarse de preferencia un guante de tela en la mano. El frasco de colecta además de estar a 37°C, deberá tener un filtro o gasa para evitar la contaminación de la muestra. El eyaculado del verraco consta de tres fracciones diferentes, las cuales deben ser reconocidas por la persona que colecta la muestra de semen, estas son:

- **Fracción Pre-espermática:** Es la primer emisión, constituida principalmente por secreciones de glándulas accesorias y tiene un volumen de alrededor de 10 ml. Esta fracción tiene como características que no tiene espermatozoides, tiene una alta carga bacteriana y presenta unos grumos que se originan de la glándula de Cowper. Es de color transparente y no interesa para la recolección. (3, 21)
- **Fracción espermática:** También conocida como fracción rica en espermatozoides, tiene un volumen de alrededor de 100 ml. Esta se diferencia de la primera, por presentar un color blanco lechoso. Esta es la fracción más importante para la colecta. Su contenido es principalmente espermatozoides y secreciones de la vesícula seminal y próstata. (3, 21)
- **Fracción Post espermática:** Esta fase tiene poco contenido de espermatozoides y es de color transparente con gran cantidad de grumos (que sirven para formar un sello en la hembra luego de la eyaculación). No tiene ningún interés para la recolección, pero la importancia de su observación es que en ocasiones está alternada con emisión de fracción rica en espermatozoides. Tiene un volumen aproximado de 200 ml. y está constituido por gran cantidad de plasma seminal, secreciones de la próstata y grumos de la glándula de Cowper. (3, 21)

#### 4.4.2 Evaluación de la calidad espermática

Luego de la colecta de semen debemos llevar esta muestra lo antes posible a nuestro laboratorio para poder evaluarla y extenderla. El laboratorio debe encontrarse lo más cercano posible al lugar de colecta, para evitar el deterioro de la muestra de semen.

La evaluación de la calidad espermática debe hacerse rápidamente, utilizando material limpio, estéril y a la misma temperatura a la que se encuentra la muestra de semen. La metodología para la evaluación de la calidad espermática se realiza dependiendo de la tecnología con que se cuenta para este fin. Es por eso que existen diferentes formas para realizar una misma prueba, por ejemplo el método colorimétrico para medir la concentración y el método de la cámara de Neubauer.

La calidad del eyaculado ha sido tradicionalmente evaluada con el espermiograma clásico, que está basado en la aplicación de una serie de pruebas de una ejecución relativamente simple y que pueden ser realizadas con un costo moderado. En el análisis rutinario se incluye un examen macroscópico y microscópico del eyaculado. Debe aclararse que ninguno de los parámetros del espermiograma clásico por sí solo parece ser suficiente para predecir adecuadamente la fertilidad, aunque la información combinada de todos ellos ofrece una buena estimación de la calidad seminal. (6)

El espermiograma es la serie de pruebas macro y microscópicas que comúnmente comprenden las siguientes mediciones:

- Evaluación macroscópica
  - Volumen
  - Temperatura
  - pH
  - Características organolépticas (color, impurezas, olor)
- Evaluación microscópica
  - Motilidad
  - Concentración
  - Aglutinaciones
  - Tinción supravital (evaluación de vivos y muertos)
  - Defectos o anormalidades (15, 19, 21)

#### **4.4.2.1 Evaluación macroscópica**

##### **4.4.2.1.1 Volumen**

El semen es colectado usualmente en recipientes que permiten la determinación del volumen. Debemos recordar que solo se colectara la fracción rica del eyaculado. Se utilizan comúnmente dos métodos para la determinación del volumen de un eyaculado.

El primer método, consiste en tarar el recipiente utilizado para la colecta de semen en una balanza, y al obtener la muestra de semen, pesarla. El peso en gramos se considera como el volumen en mililitros. Se debe tener en cuenta que la referencia de que un gramo es igual a un mililitro, es verdadera para el agua, y que el semen tiene un peso mayor que el agua, pero se utiliza para efectos prácticos de la evaluación. (19, 20)

En el segundo método, se utilizan recipientes con graduación, ya sea que colectemos directamente en el recipiente graduado (probeta, beaker o bolsa de colecta) o hacer una transferencia a un recipiente graduado (que debe tener la misma temperatura). (3, 20)

Cualquier eyaculado con un volumen menor a 50 ml en un verraco maduro se debe descartar. En cerdos jóvenes en entrenamiento muchas veces obtenemos volúmenes menores a 50 ml, pero esto no es motivo para descalificación. (15)

#### **4.4.2.1.2 Temperatura**

Existen varios aspectos importantes en cuanto al factor de temperatura de una evaluación de la calidad espermática. La temperatura debe medirse y registrarse, usualmente se encuentra entre 35 y 37 °C. Debe descartarse cualquier eyaculado con una temperatura de 34°C o menor. El semen colectado debe de mantenerse en baño María durante toda la evaluación de la calidad espermática, la cual no debe exceder 15 minutos. Cualquier fluctuación en la temperatura del semen reduce la viabilidad del esperma, 2 a 3 °C arriba o debajo puede reducir hasta un día la viabilidad. La responsable de esta sensibilidad parece ser la membrana lipídica. Al reducir la temperatura los movimientos laterales de los fosfolípidos de la membrana se reducen y se producen separaciones de fases lipídicas, alterando irreversiblemente las proteínas de las membranas. (14, 15)

De igual manera el material que entra en contacto con el semen y que está destinado a mantener vivos a los espermatozoides para evaluación debe estar a la misma temperatura. Es por eso indispensable que el laboratorio que va a procesar semen cuente con equipo que tenga esta capacidad.

Luego de evaluar y extender el semen, este se enfría hasta 17 °C en forma gradual para no agotar el buffer ni los nutrientes del semen o del extensor. Esta temperatura además frena (sin evitar) el crecimiento bacteriano. El beneficio de la reducción de la temperatura es en sí, detener el crecimiento bacteriano sin alterar la membrana espermática. (14)

#### **4.4.2.1.3 pH**

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

eyaculado puede medirse utilizando tiras indicadoras y debe de hacerse en forma rutinaria, ya que podríamos detectar algún tipo de alteración (ejemplo, contaminación bacteriana). (6, 14)

#### **4.4.2.1.4 Características organolépticas**

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

- Color – Tiene que ser blanco lechoso, aunque en algunos casos es de color amarillo pálido en casos normales. Una coloración roja oscura o café nos indica la presencia de sangre. (15)
- Presencia de impurezas – La muestra de semen debe estar libre de impurezas, como rastros de tierra, pelo, etc. Para lograr esto, debemos cubrir nuestro recipiente de colecta con un filtro o doble gasa.
- Olor - Esta debe presentar un olor típico y característico del semen de verraco. Si percibiéramos un olor que no pertenece, indicaría contaminación con orina, fluido prepucial o alguna alteración patológica del tracto reproductivo. (15, 21)

#### **4.4.2.2 Evaluación microscópica**

La calidad espermática es considerada en términos de porcentajes de espermatozoides móviles o morfológicamente normales. Hasta hace poco, ambos eran evaluaciones subjetivas influenciadas por el observador. A pesar de estos problemas, la estimación de los espermatozoides móviles y la morfología espermática son el método estándar usado por la mayoría de laboratorios de reproducción. Algunas explotaciones comerciales utilizan una estimación ayudada por computadora. Estos sistemas utilizan tecnología de computadora para rastrear el movimiento individual de las células espermáticas (incluyendo, dirección, velocidad, ángulo de curvatura entre la cabeza y cola) y pueden proveer un examen más certero, objetivo y repetible para estimación de concentración y motilidad. Este sistema representa una inversión inicial muy alta, por lo que aún no es tan popular en centros de IA (1, 10)

##### **4.4.2.2.1 Motilidad**

La función básica del espermatozoide es fecundar el óvulo, valiéndose de varias características para lograr su objetivo. La capacidad de movimiento, es desarrollada por el espermatozoide conforme madura su morfología y desarrolla su maquinaria metabólica. La motilidad es esencial

para lograr la fecundación, sin embargo la capacidad de movimiento no es necesariamente un indicativo de la capacidad fecundante. Los espermatozoides necesitan no solo de su habilidad para desplazarse para lograr fecundar un óvulo ya que los espermatozoides pierden la capacidad fecundante antes que la motilidad. (9)

Los espermatozoides son impulsados por un flagelo equipado con proteínas contráctiles estratégicamente dispuestas en organelos longitudinales, las fibras gruesas, y con subfilamentos asociados y microtubulos con los que aportan la suficiente fuerza para superar la resistencia estructural interna y el arrastre viscoso externo de los líquidos extracelulares.

La estimación de la motilidad es una de las pruebas más importantes dentro de la evaluación espermática, por tener un impacto en la fertilidad de la dosis seminal. La motilidad espermática en el eyaculado se estima visualmente bajo varios campos del microscopio óptico el cual debe contar con una platina térmica con una temperatura igual a la de la muestra de semen. (9, 17, 18)

Existen dos características de los espermatozoides que deben de ser considerados en la evaluación de la motilidad:

- **Motilidad general** – Es una prueba cuantitativa en la que se estima el porcentaje de espermatozoides totales que presentan movimiento.
- **Motilidad individual** – Es una prueba cualitativa, en la que se aprecia el tipo de movimiento de ciertos espermatozoides. Los espermatozoides en su mayoría (en condiciones normales) demuestran un patrón de movimiento en forma lineal. Los patrones de movimiento circular o en reversa es a menudo indicio de choque térmico por frío o de que el medio no es isotónico con el semen. El movimiento oscilatorio es frecuente observarlo en espermatozoides viejos o moribundos. (9)

Actualmente existen métodos más modernos para la medición de la motilidad con la utilización de técnicas asistidas por computadoras. Además de la motilidad, podemos medir otro tipo de variables como velocidad, tipo de movimiento, trayectoria recorrida, desplazamiento angular. (3)

#### **4.4.2.2 Concentración**

La determinación de la concentración es uno de los parámetros más importantes, ya que con el dato de volumen de la muestra de semen, sirven para la determinación de dosis seminales. La

concentración es la relación entre cantidad de espermatozoides y el volumen del eyaculado. La concentración puede ser medida por cualquiera de los siguientes métodos:

- Hematocitómetro – Es un método manual de conteo con microscopio utilizando una placa calibrada (cámara de Neubauer o Bürker)
- Espectrofotómetro – Mide la concentración de espermatozoides pasando una luz a través de la muestra y leyendo la densidad óptica del semen.
- Método asistido por computadora – Se unen imágenes digitales a la computadora para exámenes computarizados que miden la concentración y la motilidad de la muestra de semen. (3, 15, 21)

El extensor de semen debe agregarse tan pronto como sea posible, y la temperatura del semen debe mantenerse. Para asegurar una actuación reproductiva exitosa, las dosis finales de IA deben contener suficientes espermatozoides para que estén disponibles un mínimo de 2,500,000,000 espermatozoides viables en el momento de inseminación. (15)

En general para alcanzar una concentración de  $2,5 \times 10^9$  de espermatozoides viables con buena calidad de semen al momento de la IA (sin importar el extensor) usualmente requiere dosis seminales con un conteo de espermatozoides totales entre 3.2 a 3.5 billones de células al momento del procesamiento. Estas concentraciones se recomiendan cuando se utiliza el método de hemacitómetro, para determinar la concentración. Debido a las variaciones inertes de la tecnología y los procedimientos, cuando se utiliza espectrofotómetro para determinar la concentración, estos deben contener  $0.5 \times 10^9$  más de espermatozoides, por dosis. (15)

#### **4.4.2.2.3 Aglutinaciones**

Se conoce como aglutinación espermática, al acúmulo de espermatozoides, que puede ser observado durante el examen al microscopio, ya sea en el eyaculado fresco o en el semen diluido. La medición de la aglutinación, se hace al mismo tiempo que la evaluación de la motilidad espermática. Los espermatozoides aglutinados pueden estar vivos o muertos; y estar unidos a células epiteliales o sin éstas. La calificación de las aglutinaciones se puede hacer de varias formas: utilizando porcentajes, sistemas de puntuación de 1 a 5, o solamente con adjetivos como (leve, media o alta). (11)

La apreciación de altas cantidades de aglutinaciones reducirán grandemente los espermatozoides disponibles para la inseminación. Las aglutinaciones pueden ser causadas por: cambios de pH del semen; shock térmico, contaminación bacteriana, concentración muy alta de

espermatozoides o por partículas (incluyendo la presencia de gel de las glándulas bulbouretrales) en el semen por un mal filtrado durante la toma de muestra. (3, 11, 18)

La evaluación de las aglutinaciones por sí sola no es lo suficientemente importante como para descalificar una muestra de semen. Por esta razón se deben analizar los resultados de la prueba de aglutinaciones en conjunto con las otras evaluaciones del espermograma. (11)

Otra característica importante a tomar en cuenta, es que debido a la estabilización química del extensor, el número de aglutinaciones disminuye considerablemente al diluir el semen. Es por esto que se puede contar un número menor de aglutinaciones en la dosis seminal extendida, que en el eyaculado no extendido. (11)

#### **4.4.2.2.4 Proporción de vivos y muertos (Tinción supravital)**

La proporción de espermatozoides vivos y muertos puede estimarse por la prueba de tinción supravital realizada con un frote hecho con colorantes. Las células que estaban vivas cuando se aplicó la tinción excluyen el colorante, mientras que las que estaban muertas se tiñen de rojo con la eosina. La captación de color se debe a un daño en la membrana celular del espermatozoide que permite la captación del colorante, mientras que las paredes que no están dañadas no aceptan colorante. Los resultados se correlacionan con estimaciones visuales de la proporción de células con movimiento progresivo, pero el porcentaje de éstas es menor que el de espermatozoides teñidos. (9)

#### **4.4.2.2.5 Morfología espermática (Defectos o anomalías)**

La mayor parte de las muestras de semen contienen algunos espermatozoides de estructura anormal. Por lo común esto no se asocia a bajas tasas de fecundidad a menos que la proporción de espermatozoides anormales exceda el 20%; e incluso en estos casos, algunos tipos de anomalías pueden no asociarse a infertilidad. Es posible obtener una estimación precisa de los tipos de espermatozoides anormales y su incidencia por medio de preparaciones en portaobjetos con tinción supravital. (9)

La determinación de la morfología espermática en un eyaculado es una actividad que consume tiempo, y por lo regular no se hace en cada eyaculado de cada verraco. Debe de hacerse de acuerdo a una rutina, por ejemplo una vez al mes para cerdos con buena calidad espermática, y con mayor frecuencia en verracos problemáticos. Las anomalías más comunes incluyen: cabeza anormal o

desprendida; inclusiones citoplasmáticas anterior media o distal; cola arrollada o doblada, etc. (9, 17)

La evaluación morfológica de los espermatozoides utilizando un microscopio es considerada como un buen método para predecir la fertilidad de los verracos. Un eyaculado normal no debe contener más del 10% de espermatozoides con alguna anormalidad. Debe darse atención especial al acrosoma, ya que tiene un cometido importante en la fecundación. En el verraco, el borde apical se deteriora con la antigüedad del espermatozoide o en caso de lesión de éste, en cuyo caso puede perderse la enzima acrosina. Es posible que con el tiempo el acrosoma se reblandezca y se pierda. Esto puede observarse con un microscopio de contraste de fases. (3, 9)

Las anormalidades morfológicas de los espermatozoides pueden ser primarias (defectos en la espermatogénesis), secundarios (producidos durante el paso por el epidídimo) o terciarias (durante eyaculación o manejo inadecuado del semen). (9)

#### 4.4.2.3 Resumen de parámetros mínimos de calidad en eyaculado de verraco (cuadro #1)

PARÁMETRO	VALORACIÓN MÍNIMA DE CALIDAD
Volumen	50 mililitros
Temperatura	34 °C
pH	6.8
Coloración	Blanco (única coloración aceptada)
Motilidad	85% de motilidad general
Concentración	100,000,000 de espermatozoides
Aglutinaciones	75% de espermatozoides no aglutinados en un campo visual a 100x
Proporción de vivos y muertos	65 % de espermatozoides vivos
Morfología (defectos)	80 % de espermatozoides normales

(18)

#### 4.4.3 Preparación de dosis seminales

Luego de evaluar la calidad de semen, el siguiente paso en la IA es la preparación de las dosis seminales. Se debe recordar que el número y la calidad de espermatozoides inseminados determinan el impacto del verraco sobre el tamaño de la camada. El cálculo de dosis seminales se realiza por lo regular utilizando los datos de concentración espermática y del volumen del eyaculado. Existen en la actualidad métodos computarizados en los cuales se determina automáticamente el

número de dosis a preparar. En la elaboración de las dosis seminales se utilizan extensores de semen para aumentar el número de hembras que se pueden inseminar y conservar por más días. (5)

#### **4.4.3.1 Extensores de semen**

El extensor de semen es la solución que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado. (7)

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del aparato genital femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un período de tiempo muy limitado. Para poder conservar los espermatozoides durante períodos prolongados es necesario reducir la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la extensión en un medio adecuado y la reducción de la temperatura. (7)

##### **4.4.3.1.1 Funciones del extensor**

Desde su invención, las funciones de los extensores han sido básicamente las mismas: Aumentar el volumen de eyaculado y preservar la viabilidad de los espermatozoides. Para preservar la viabilidad del espermatozoide el extensor debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Aportar nutrientes para mantener el metabolismo celular de la célula espermática.
- Estabilizar la membrana celular.
- Controlar el pH del medio.
- Controlar la presión osmótica.
- Inhibir el desarrollo microbiano. (8, 14)

##### **4.4.3.1.2 Aporte de nutrientes**

El espermatozoide tiene la capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más utilizada en la composición de los extensores, es la glucosa, aunque se han usado otras (galactosa, fructosa, ribosa o trehalosa) sin resultados que hayan superado a la glucosa. (7)

#### **4.4.3.1.3 Estabilización de membrana**

Algunas sustancias en el extensor se adicionan con el fin de prevenir o retardar alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas de los espermatozoides. Las principales sustancias utilizadas son seroalbúmina bovina (BSA), hidroxitolueno butilado (BTH), etilén disódico diamino tetraacetato (EDTA), polivinil pirrolidona (PVP-40), y alcohol polivinílico. (7, 14)

#### **4.4.3.1.4 Regulación del pH**

El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a  $7.4 \pm 0.2$ , al igual que otros fluidos orgánicos y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del espermatozoide y su motilidad. El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide (el carbohidrato principal es la glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como índice de calidad seminal.

La adición de agentes tamponadores ayudan, por tanto, a controlar el pH del medio. Entre los tamponadores más simples se encuentran el bicarbonato y el citrato sódico, que presentan una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros tamponadores más complejos como el ácido 3N-Morfolino propanesulfónico (MOPS) o el ácido N-2-hidroxietil piperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura. (7, 14)

El pH de los extensores utilizados oscila entre 6.8 y 7.2, pero hay que tener en consideración que el pH de estos medios no se estabiliza hasta pasado unos 60-90 minutos del inicio de la preparación en agua y que los distintos extensores presentan un diferente patrón de cambio de su pH a lo largo del tiempo. Por lo que se han de tomar las medidas necesarias durante la preparación de los extensores antes de su uso, para evitar problemas en el proceso de conservación. (7, 16)

#### **4.4.3.1.5 Control de presión osmótica**

El espermatozoide porcino presenta una presión osmótica de 290-300 mOsm, y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio (240-380 mOsm). Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la motilidad ni la viabilidad del esperma se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y

290 mOsm, mientras que al reducir por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad. (7)

#### **4.4.3.1.6 Inhibición del crecimiento bacteriano**

En la mayoría de los casos el tejido testicular y las glándulas accesorias del verraco están libres de bacterias y por tanto la contaminación bacteriana del eyaculado se produce durante el proceso de recogida seminal. Para controlar el crecimiento microbiano en el extensor es necesario añadir un agente antibiótico, ya que los componentes del extensor, así como la temperatura a las que se conservan las dosis, permiten el crecimiento de la mayoría de bacterias gram negativas entre las que se incluyen (*E. Coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas*). (7)

La contaminación bacteriana principalmente produce una serie de alteraciones entre las que se encuentra una disminución de la motilidad, aumento en las aglutinaciones espermáticas, aumento del porcentaje de acrosomas alterados y una reducción del pH a niveles ácidos, que conducen a una reducción en el tiempo de conservación de las dosis seminales. Por lo tanto, la adición del antibiótico en la adecuada concentración favorecerá la supervivencia espermática. (7)

La adición de penicilina y estreptomycin (1 g/L) fue en un inicio la combinación más utilizada, posteriormente se han utilizado con éxito aminoglicósidos, entre los que se encuentra la gentamicina, neomicina y la kanamicina, en concentraciones próximas a los 200 mg/L. Últimamente, se está aplicando una nueva generación de antibióticos (ceftiofur, apramycin), sin tenerse resultados concluyentes sobre su uso. (7,8)

#### **4.4.3.1.7 Tipos de Extensores**

Los extensores han sido clasificados en dos grandes grupos, dependiendo del tiempo de conservación y tomando en cuenta la distancia entre estructuras de distribución de dosis seminales. La clasificación es:

- Extensores de conservación a corto plazo - cuando funcionan por menos de 3 días (ejemplo: BTS).
- Extensores de conservación a largo plazo - cuando funcionan por más de 4 días (ejemplo: MR-A)

#### 4.4.3.1.8 Extensores de semen porcino agrupados de acuerdo a su duración (cuadro #2)

CORTA DURACIÓN	LARGA DURACIÓN
BL - 1 – Beltsville Liquid	Acromax
BTS – Beltsville Thawing Solution	Androhep
IVT – Illinois Variable Temperature	Modena
Kiev	MR - A
Vital	Mulberry III
	Reading
	X – Cell
	Zorlesco
	Zorpva

#### 4.4.3.1.9 Elección del Extensor

Al comparar extensores de corta frente al de larga duración, en general, no se observan diferencias ni en fertilidad ni prolificidad en los primeros 3-4 días de conservación en cerdas multíparas, aunque el de larga duración permite su uso hasta 7 días. Sin embargo estas diferencias se reducen en el caso de cerdas primíparas, no existiendo diferencia alguna en el tamaño de camada. (7)

La elección del extensor debe ir asociada a las condiciones particulares de cada explotación porcina y al tipo de uso que se vaya a hacer de él. Cuando el tiempo de conservación sea inferior a tres días, no observándose diferencias en calidad seminal ni en fertilidad, la elección más racional sería la utilización de un extensor de corta duración (tipo BTS) con costos menores y con unos resultados equivalentes a los de extensores de larga duración. Cuando se pretende conservar dosis seminales más allá de 4 días (largas distancias, evaluaciones sanitarias del semen, etc.) se deben utilizar extensores de larga duración y aumentar la concentración de la dosis para compensar las pérdidas por envejecimiento de los espermatozoides. (7)

#### 4.4.3.2 Extensor BTS

El Extensor BTS es un extensor de corta duración. Sus siglas corresponden a Beltsville Thawing Solution o Solución de descongelamiento Beltsville (Maryland, EUA). El Dr. Lawrence Johnson, del departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, originalmente desarrollo este medio como extensor para utilizarlo después de descongelar pellets de semen de verraco. El BTS es actualmente utilizado para extender el volumen de semen que luego va a ser utilizado para la IA, 1 ó 2 días después de la colecta. (13)

Los principales ingredientes de este extensor son: la glucosa, citrato sódico, bicarbonato de sodio, EDTA y el cloruro potásico. (8)

#### **4.4.3.3 Cálculos para la preparación de dosis seminales**

Al preparar la dosis, debemos de establecer cual es la concentración a la que deseamos trabajar por dosis seminal. Existen muchos criterios respecto a la concentración ideal para trabajar, pero para fines prácticos, se trabaja entre  $2.5$  y  $5 \times 10^9$  espermatozoides por dosis seminal. Para la determinación del número de dosis se puede utilizar la siguiente fórmula:

##### **4.4.3.3.1 Fórmula para la determinación del número de dosis seminales que podemos elaborar:**

$$N = \frac{(A)(VE)}{C}$$

N – Número de dosis

A – Número total de espermatozoides (determinado en la prueba de concentración)

VE – Volumen del eyaculado (determinado en la evaluación del eyaculado)

C – Concentración que deseamos en la dosis seminal (Ej.:  $3 \times 10^9$ ) (12, 21)

Una vez determinado el número total de dosis, podemos determinar el volumen total de eyaculado y extensor que debemos utilizar:

##### **4.4.3.3.2 Fórmula para la determinación del volumen total:**

$$VT = (N)(CB)$$

VT - Volumen total

N - Número de dosis (determinado de la fórmula anterior)

CB - Capacidad de la botella de inseminación (Dependiendo del equipo que tengamos, por lo regular existen botellas de 75 y 100 ml.) (12, 21)

Como último paso debemos obtener la cantidad de extensor a mezclar al eyaculado, partir de la fórmula anterior.

#### **4.4.3.3 Fórmula para la determinación de la cantidad de extensor a utilizar:**

$$E = VT - VE$$

E - Cantidad de extensor a utilizar

VT - Volumen total (determinado del resultado de la fórmula anterior)

VE - Volumen del eyaculado (determinado de la evaluación del eyaculado) (12, 21)

Con esta información podemos realizar la extensión del eyaculado, teniendo la opción de conservarlo o utilizarlo para inseminar hembras que lo necesiten.

#### **4.4.4 Inseminación de la hembra**

Una vez confeccionadas las dosis seminales solo queda inseminar a la hembra. Las dosis seminales deben transportarse con cuidado hacia donde la cerda va a ser inseminada. El material a utilizarse debe estar limpio y de preferencia ser descartable. El equipo de inseminación puede consistir básicamente en un catéter (existen diferentes tipos) y una botella de IA. Actualmente el método más común para la inseminación de cerdas es el método manual.

##### **4.4.4.1 Resumen del método manual de inseminación artificial utilizando catéter en espiral o tipo Melrose.**

Este método es el más común en nuestro medio y consiste en utilizar un catéter de inseminación y luego de lubricarlo introducir por la vulva a 45°. Al llegar a cervix girar el catéter en contra de las agujas de reloj y asegurar que esté colocado correctamente. Luego conectar la botella de IA y dejar que fluya el semen, haciendo presión sobre el dorso de la cerda. Al terminar de aplicar la dosis, girar el catéter a favor de las agujas del reloj, mientras se hala para retirarlo. (21)

Se debe trabajar en forma limpia para evitar contaminación de las cerdas y llevar registro de las actividades.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Recursos humanos

- Estudiante investigador
- Médicos Veterinarios asesores
- Técnicos de la granja experimental de cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

#### 5.1.2 De laboratorio

- Baño María
- Platina térmica
- Microscopio de contraste de fases con platina térmica
- Cámara conservadora
- Potenciómetro
- Horno
- Agitador magnético
- Papel indicador de pH
- Termómetro
- Cámara de Neubauer
- Láminas portaobjeto y cubreobjeto
- Contador manual
- Pipetas descartables
- Toallas de papel desechable
- Cristalería de laboratorio (con diferentes capacidades volumétricas)
- Paquetes de 50 g. de extensor de semen porcino comercial, BTS
- Botellas de IA porcina de 100 ml. de capacidad
- Agua desmineralizada
- Colorante Eosina
- Solución de Cloruro de Sodio al 10%

### **5.1.3 De campo**

- Termo de colecta con doble capa de gasa
- Hielera para transporte de muestra de semen
- Toallas de papel desechable
- Guante de algodón para colecta
- Potro para monta
- Alfombras de hule

### **5.1.4 Biológicos**

- Verraco de la Granja Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, para obtener eyaculado.

### **5.1.5 Centros de Referencia**

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC)
- Instituto de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USAC
- Biblioteca Central, USAC
- Referencias de Internet

## **5.2 Métodos**

### **5.2.1 Medición de las fluctuaciones de pH del extensor de semen**

Previo al experimento se evaluó el pH de 3 paquetes del extensor de semen porcino, preparado a 37°C. De cada paquete de extensor de semen preparado, se tomaron 2 muestras para evaluar un total de 6. Se midió cada 10 minutos el pH del extensor diluido utilizando un potenciómetro digital. Los resultados de esta medición, sirvieron para establecer los momentos de fluctuación durante la estabilización del pH del extensor y se anotaron en la tabla de resultados de fluctuación de pH de diluyentes (anexo 10.1)

### **5.2.2 Preparación del primer extensor**

Dos horas antes de la colecta de semen se preparó el primer extensor a una temperatura de 37°C.

### **5.2.3 Colecta de Semen**

Con el recipiente de colecta previamente atemperado a 37°C se procedió a extraer semen de un verraco utilizando el método manual de fijación. El frasco de colecta estuvo cubierto con una doble capa de gasa para evitar la contaminación de la muestra incluyendo el gel proveniente de la glándula de Cowper. Se utilizó un guante de tela en la mano para hacer presión y obtener el eyaculado.

### **5.2.4 Evaluación del eyaculado**

Luego de coleccionar la muestra, se llevó rápidamente al laboratorio y se mantuvo en baño María a 37°C mientras se evaluó. Las pruebas que se realizaron al eyaculado fueron:

- Pruebas macroscópicas:
  - Volumen
  - Temperatura
  - Color y consistencia
  - Olor
  - pH
- Pruebas microscópicas
  - Concentración por método de Hemacitómetro
  - Motilidad general e individual
  - Determinación de vivos y muertos
  - Aglutinaciones

### **5.2.5 Preparación del segundo extensor**

Al terminar la evaluación se preparó el segundo extensor justo antes de la preparación de las dosis seminales.

### **5.2.6 Preparación de las dosis seminales**

Se determinó el número de dosis seminales en base a los resultados de la prueba de concentración obtenidos en la evaluación del semen. El eyaculado se dividió en dos y se mezcló con la cantidad adecuada de cada extensor preparado. Se llenaron las botellas para IA, se identificaron y se conservaron a 17°C en la cámara conservadora. La concentración por botella se preparó para que contenga  $3 \times 10^9$  espermatozoides.

### **5.2.7 Evaluación del semen extendido**

El semen que fue extendido se evaluó cada 24 horas hasta llegar a las 72 horas después de su preparación, que es el tiempo máximo de conservación del extensor seleccionado. La primera evaluación se realizó luego de haber preparado las dosis seminales. La dosis seminal evaluada fue calentada a 37°C y luego de su utilización fue descartada. Las pruebas realizadas, a cada dosis seminal durante su evaluación, fueron:

- Motilidad general
- Motilidad individual
- Aglutinaciones
- Determinación de vivos y muertos

#### **5.2.7.1 Motilidad general**

La metodología para la prueba de motilidad general es la siguiente:

- Homogenizar la muestra de semen
- Tomar una o dos gotas de semen y colocarlas sobre una lámina portaobjetos. Cubrir con una lámina cubreobjetos. La lámina debe estar atemperada a 37°C.
- Utilizando los objetivos de 10X y 20X, se calcula el porcentaje de espermatozoides en movimiento.

#### **5.2.7.2 Motilidad individual**

La metodología para la prueba se explica a continuación:

- En la misma preparación para evaluar la motilidad general (primeros dos puntos del inciso 5.2.7.1), se evalúa la calidad del movimiento individual, utilizando calificaciones de 0 – 5, en donde 0, significa que no hay movimiento y 5 significa que los movimientos son rápidos y rectilíneos.

### **5.2.7.3 Aglutinaciones**

La metodología para la determinación del número de aglutinaciones se explica a continuación:

- En la misma preparación utilizada para evaluar la motilidad general (primeros dos puntos del inciso 5.2.7.1), se evalúa el número de cúmulos de espermatozoides (aglutinaciones) en varios campos visuales y se promedian.
- El resultado de esta prueba se determina por medio de cruces. Cada cruz de calificación equivale a rangos de 1 a 5 aglutinaciones. Como ejemplo, una cruz (+) equivale a 1-5 aglutinaciones; 3 cruces (+++) equivale a 10-15 aglutinaciones. La calificación máxima es 4 cruces.

### **5.2.7.4 Determinación de vivos y muertos**

La metodología para la determinación del número de vivos y muertos se explica a continuación:

- Se homogeniza la muestra de semen.
- Se toma una gota de semen y una gota de colorante eosina y se colocan en un extremo de una lámina portaobjetos. Se hace un frote y se deja secar por un momento. El frote se observa con el objetivo de 40X, y se hace un conteo de 200 espermatozoides, diferenciando cuántos de éstos son coloreados y cuántos no coloreados.
- El resultado se expresa en el porcentaje de espermatozoides vivos (no coloreados) del total de 200 espermatozoides.

### **5.2.8 Conservación de las dosis seminales**

Las dosis fueron conservadas por 72 horas en una cámara conservadora a 16°C.

### **5.2.9 Tratamientos**

Se utilizaron dos tratamientos para el experimento.

- Tratamiento A (control) - correspondió a las dosis seminales mezcladas con extensor de semen porcino preparado dos horas antes de la extensión.
- Tratamiento B (experimental) - correspondió a las dosis seminales mezcladas con extensor de semen porcino preparado inmediatamente antes de la extensión.

Esta división se aplicó para cada una de las pruebas.

### **5.2.10 Unidad experimental**

La unidad experimental fue la dosis seminal de IA preparada con semen de verraco y extensor comercial. Cada eyaculado del verraco se dividió en dos partes iguales. Se hicieron 16 evaluaciones por cada tratamiento, utilizando 4 eyaculados del mismo verraco divididos en 4 semanas de trabajo.

## **5.3 Análisis estadístico**

El análisis estadístico del experimento se estableció individualmente en base a cada una de las pruebas para la determinación de la calidad seminal, que se describen a continuación.

### **5.3.1 Motilidad general**

La calificación de la motilidad está expresada en forma de porcentaje. La variable en esta prueba fue el porcentaje de espermatozoides móviles, que estuvo estimado por la visualización con microscopio. Se comparó si existe diferencia entre la motilidad general del tratamiento A y la motilidad del tratamiento B, utilizando la prueba de “Diferencia de Proporciones”. Para esta prueba se hicieron 16 repeticiones por tratamiento.

### **5.3.2 Motilidad individual**

La calificación en esta prueba está expresada con números de 0 a 5, indicando nula motilidad o movimientos rectilíneos y rápidos. Esta es una prueba cualitativa. La variable en esta prueba fue la calidad de movimiento que presentaron los espermatozoides en forma individual, expresada en forma numérica como calificación. Se comparó si existe diferencia entre la motilidad individual del tratamiento A y la motilidad individual del tratamiento B. Para esta prueba se hicieron 16 repeticiones por tratamiento.

### **5.3.3 Aglutinaciones**

La calificación en esta prueba se da en forma de cruces (“+”), en donde una cruz de calificación corresponde a un intervalo de 1 a 5 aglutinaciones por campo visual y cada cruz extra corresponde a 5 aglutinaciones más. La variable en esta prueba fue el número de aglutinaciones por campo visual, expresada en número de cruces. Se comparó si existe diferencia entre el número

de aglutinaciones del tratamiento A y el número de aglutinaciones del tratamiento B. Para esta prueba se hicieron 16 repeticiones por tratamiento.

#### **5.3.4 Determinación de vivos y muertos**

La calificación de esta prueba se da en forma de porcentaje. La variable en esta prueba fue el porcentaje de espermatozoides vivos. Se comparó si existe diferencia entre el porcentaje de espermatozoides vivos del tratamiento A y el porcentaje de espermatozoides vivos del tratamiento B, utilizando la prueba de ‘Diferencia de Proporciones’. Para esta prueba se hicieron 16 repeticiones por tratamiento.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Medición de las fluctuaciones de pH del extensor de semen

De la evaluación de las 6 muestras de extensor de semen porcino preparado, obtuvimos la siguiente información:

- Se comprobó que existe variabilidad en el pH del extensor de semen porcino a lo largo de un período de 2 horas, posteriores a su preparación. Esto nos indica que los espermatozoides son expuestos a cambios en el pH, cuando no se permite un tiempo de estabilización luego de preparar el extensor. El efecto de esta variabilidad de pH, sobre la calidad espermática, es discutido en el inciso 6.6 y sus sub-incisos 6.6.1, 6.6.2, 6.6.3.
- Se determinó el comportamiento del pH del extensor y estableciendo los momentos de fluctuación. El promedio del pH de los resultados (ver cuadro #3) muestra dos cambios de pH en el tiempo. El primero ocurre hacia los 10 minutos de haberse preparado el extensor. El pH desciende de 7.1 a 7.0 y se mantiene igual durante los siguientes 40 minutos. El segundo cambio ocurre hacia los 60 minutos, cuando regresa al pH inicial (7.1) y se mantiene así hasta el final de la evaluación (2 horas). En este resultado observamos que el pH del extensor de semen preparado no tiene cambios bruscos ni frecuentes. Además, se observa un período estable de pH luego de cada variación. Un dato importante, es que no se obtuvo resultados fuera del rango normal del pH del semen (6.8 a 7.4), lo que significa, que los espermatozoides no son expuestos en ningún momento a condiciones incompatibles a su medio. El efecto de esta observación en discutido el inciso 6.6 y sus sub-incisos 6.6.1, 6.6.2, 6.6.3.

**FLUCTUACIONES DE PH DEL EXTENSOR DE SEMEN PORCINO COMERCIAL (cuadro # 3)**

MINUTOS	MUESTRA A		MUESTRA B		MUESTRA C		PROMEDIO
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	
0	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
10	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
20	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
30	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
40	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
50	7.1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
60	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
70	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
80	7.1	7.1	7.1	7.1	7.0	7.1	7.1
90	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
100	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.1	7.1
110	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
120	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.1	7.1

## 6.2 Motilidad General

Los resultados obtenidos en la prueba de motilidad general, fueron:

<b>Resultados de Motilidad General</b> (Cuadro # 4)								
	Control (%)				Experimental (%)			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Semana 1	85	80	70	60	85	80	70	60
Semana 2	85	80	65	60	85	80	60	55
Semana 3	85	80	75	70	85	80	70	65
Semana 4	85	80	75	70	85	80	75	65

Utilizando la prueba “*Diferencia de Proporciones*”, se determinó que no existe diferencia estadística entre la motilidad general de los grupos evaluados. La inestabilidad del pH del extensor de semen porcino del grupo experimental, no tiene efecto sobre el porcentaje de espermatozoides con movimiento, cuando se compara con un extensor preparado dos horas antes de su utilización (grupo control). En ambos grupos, los resultados del día 0 y del día 1, son idénticos. (Ver anexo 11.3)

## 6.3 Motilidad Individual

Los resultados obtenidos en la prueba de motilidad individual, fueron:

<b>Resultados de Motilidad Individual</b> (Cuadro # 5)								
	Control				Experimental			
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Semana 1	4	4	3	3	4	4	3	3
Semana 2	4	4	4	3	4	4	3	3
Semana 3	4	4	4	3	4	4	3	3
Semana 4	5	4	3	3	5	4	4	3

Se determinó que no existe diferencia entre la motilidad individual de los espermatozoides de los grupos evaluados. La inestabilidad del pH del extensor de semen porcino del grupo experimental, no tiene efecto sobre la calidad de movimiento de espermatozoides, cuando se compara con un extensor preparado dos horas antes de su utilización (grupo control). Debido a que los resultados tuvieron una tendencia similar, no ameritó el análisis estadístico para esta prueba. (Ver anexo 11.4)

## 6.4 Aglutinaciones

Los resultados obtenidos en la prueba de cuantificación de aglutinaciones, fueron:

<b>Resultados de Aglutinaciones</b> (Cuadro # 6)								
	Control				Experimental			
	<i>Día 0</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 0</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>
Semana 1	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(++)	(++)
Semana 2	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(++)	(++)
Semana 3	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)
Semana 4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Se determinó que no existe diferencia entre la cantidad de aglutinaciones de los grupos evaluados. La inestabilidad del pH del extensor de semen porcino del grupo experimental, no tiene efecto sobre la cantidad de aglutinaciones de espermatozoides, cuando se compara con los resultados del extensor preparado dos horas antes de su utilización (grupo control). Debido a que los resultados tuvieron una tendencia similar, no ameritó el análisis estadístico para esta prueba. (Ver anexo 11.4)

## 6.5 Determinación de vivos y muertos

Los resultados obtenidos en la prueba de cuantificación de aglutinaciones, fueron:

<b>Resultados de la Prueba de Vivos y Muertos</b> (Cuadro # 4)								
	Control (% de espermatozoides vivos)				Experimental (% de espermatozoides vivos)			
	<i>Día 0</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 0</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>
Semana 1	81	79	65	59	80	78	64	56
Semana 2	82	74	66	60	76	70	59	55
Semana 3	85	79	76	73	85	77	73	63
Semana 4	85	77	76	70	85	80	76	68

Utilizando la prueba de “*Diferencia de Proporciones*”, se determinó que no existe diferencia estadística entre el porcentaje de espermatozoides vivos de los grupos evaluados. La inestabilidad del pH del extensor de semen porcino del grupo experimental, no tiene efecto sobre el porcentaje de espermatozoides vivos, cuando se compara con un extensor preparado dos horas antes de su utilización (grupo control). (Ver anexo 11.5)

## **6.6 Calidad espermática**

El análisis de los resultados obtenidos en todas las pruebas realizadas en la fase experimental de esta investigación, nos indican que no existe diferencia estadística entre el grupo control y el grupo experimental. Consistentemente se obtuvieron resultados idénticos o con la mínima diferencia, lo cual nos indica finalmente que la estabilización del pH del extensor evaluado (preparado inmediatamente antes de su utilización), en este estudio, no tiene efecto alguno sobre la calidad espermática.

Se pueden considerar 3 puntos importantes para explicar los resultados obtenidos:

- Regulación de pH en el semen.
- Rango aceptable de pH de semen de verraco.
- Cambios de pH observados.

### **6.6.1 Regulación de pH en el semen**

El pH del semen está regulado por la secreción de la vesícula seminal que contiene iones bicarbonato, los cuales tienen como funciones: regular el pH del semen por un período de tiempo limitado, estimular la motilidad de los espermatozoides y neutralizar el medio ácido del aparato reproductor de la hembra. Es probable que este mismo mecanismo de regulación, evita daño a los espermatozoides, como consecuencia de los cambios de pH producidos por la estabilización del extensor, luego de prepararse.

### **6.6.2 Rango aceptable de pH de semen de verraco**

El rango del pH normal del semen porcino va desde 6.8 hasta 7.4. En la primera parte del experimento, cuando se midió el pH del extensor durante un período de dos horas, se observó que el pH se mantenía dentro de este rango. Cualquier variación del pH fuera del rango normal, afecta la actividad normal del espermatozoide, especialmente evidente en la motilidad. En medios ácidos, la motilidad se observa marcadamente disminuida. Fisiológicamente, esto se observa en la cola del epidídimo, donde el bajo pH intraluminal suprime el movimiento espermático, y al encontrarse con un medio alcalino en el eyaculado, estimula su motilidad. Los resultados obtenidos en todas las pruebas, tanto del grupo control como del grupo experimental, no presentaron diferencia estadística, comprobando así el funcionamiento del extensor al mantener el pH del semen dentro del rango normal.

### **6.6.3 Cambios de pH observados**

Los dos cambios de pH que se observaron al promediar los resultados de la primera parte del experimento, presentan un comportamiento que no causa detrimento en la calidad espermática. Debido a que los cambios de pH, son seguidos por un período largo de estabilidad, se comprobó que no causan ninguna alteración, cuando se observan los resultados obtenidos en todas las pruebas realizadas a las dosis seminales (incisos 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5). Es así como los pocos cambios de pH, con variación mínima (inciso 6.6.2), y seguidos por períodos largos de estabilidad, no producen alteración en la calidad espermática del grupo experimental, al compararlo con el grupo control.

## VII. CONCLUSIONES

1. La calidad espermática no es afectada por los cambios de pH del extensor de semen porcino utilizado en este estudio, como consecuencia de su estabilización, cuando este es preparado inmediatamente antes de su utilización.
2. Las variaciones de pH del extensor de semen porcino utilizado en este estudio, no fluctúan fuera de los límites del rango normal para el semen porcino, durante su período de estabilización.
3. Los cambios de pH que ocurren en el extensor de semen porcino utilizado en este estudio, son muy leves en potencia y muy pocos en número para afectar la calidad espermática.
4. No existe diferencia significativa en las prueba de motilidad general, motilidad individual, determinación de vivos y muertos y determinación de aglutinaciones cuando se utiliza un extensor de semen porcino preparado inmediatamente antes de su utilización y uno preparado dos horas antes de su utilización

## **VIII. RECOMENDACIONES**

1. Usar el extensor de semen porcino preparado dos horas antes o inmediatamente después de su preparación.
2. Realizar el estudio en otros extensores de semen comerciales, ya que por su diferente composición podrían dar resultados diferentes a los obtenidos en este estudio.

## IX. RESUMEN

Con el propósito de contribuir a la inseminación artificial en la especie porcina, se investigó acerca del efecto que tienen los cambios de pH, de los extensores de inseminación artificial sobre la calidad espermática. Algunos extensores de semen porcino comerciales, presentan fluctuaciones de pH luego de ser preparados, por lo que se ha hecho la recomendación de que debe esperarse 90 minutos o hasta 120 minutos antes de mezclarlo con el semen de verraco. Se diseñó un experimento en el que se evaluó si existe deterioro en la calidad espermática, cuando se utiliza un extensor de semen porcino preparado inmediatamente antes de mezclarlo con semen porcino .

En la primer parte del experimento se utilizó un extensor de semen porcino comercial de corta duración. Se prepararon 6 muestras del extensor y se midió el pH del medio con un potenciómetro digital, por un período de dos horas. En promedio se obtuvieron 2 fluctuaciones de pH de 0.1, durante el período de evaluación. Luego de cada fluctuación se observó un período largo de estabilización de 40 y 60 minutos respectivamente.

La segunda parte del experimento consistió en evaluar la calidad espermática de dos grupos de dosis seminales. En el primer grupo, se mezcló la mitad de una muestra de semen con un extensor preparado dos horas antes. En el segundo grupo, se mezcló la otra mitad de la muestra de semen con un extensor de semen preparado inmediatamente antes de su utilización. Se estandarizó la concentración de las dosis seminales de ambos grupos a  $3 \times 10^9$  espermatozoides. Cada semana se evaluaron 4 dosis seminales de cada grupo para un total de 8 y se realizó el mismo procedimiento durante 4 semanas. Para evaluar la calidad espermática se utilizaron las pruebas de Motilidad General, Motilidad Individual, Determinación de Vivos y Muertos y Determinación de Aglutinaciones. En ninguna de las prueba se encontró diferencia significativa al comparar los dos grupos de dosis seminales.

El preparar el extensor de semen, evaluado en esta investigación, inmediatamente antes de su utilización, no tiene efecto significativo sobre la calidad espermática. Entre las posibles causas para explicar estos resultados se encuentran: la mínima variación de pH del extensor durante su estabilización y la regulación propia del semen, que amortigua cambios de pH del medio durante un período de tiempo.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. American Society of Andrology. s.f. What is semen?; how does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male? (en línea). Illinois, US. Consultado 9 jul 2004. Disponible en <http://www.andrologysociety.com/resources/handbook/ch.9.asp>
2. Becerril Ángeles, J. s.f. Manejo del semen: desarrollo de los programas de inseminación artificial (en línea) s.l. Consultado 19 jun 2004. Disponible en <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar017>
3. Córdova Izquierdo, I; Muñoz Mendoza, R; Córdova Jiménez, S; Córdova Jiménez, A; Pérez Gutiérrez, JF. 2004. Características del semen de verraco y su evaluación práctica (en línea) s.l. Consultado el 19 jun 2004. Disponible en <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar021>
4. Enos, JP. 1960. The artificial insemination of farm animals. 4ed. New Jersey, US, Rutgers. 473 p.
5. Flowers, WL. 2002. Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated (en línea) North Carolina, US. Consultado 19 junio 2004. Disponible en <http://www.asas.org/symposia/vol80/jas1705.pdf>
6. Gadea, J. 2003. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro (en línea) s.l. Consultado 19 jun 2004. Disponible en <http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle&artid=-213>
7. Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial porcina: revisión (en línea) s.l. Consultado 19 jun 2004. Disponible en <http://www.engormix.com/unevo/prueba/areadeporcicultural.asp?valor=281>
8. Gordon, I. 1997. Reproducción del cerdo. Trad. AC Mora. Zaragoza, ES, Acribia. 267 p.
9. Hafez, ESE. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6 ed. México, McGraw-Hill-Interamericana. 543 p.
10. Knox, RV. s.f. Semen processing, extending & storage for artificial insemination in swine (en línea) s.l. Consultado 9 jul 2004. Disponible en <http://www.ansci.uiuc.edu/extension/swinerepronet/Ext-Pub/SemenProcessing.pdf>

11. Kubus, S.A. s.f. Aglutinación espermática (en línea). Boletín técnico, Madrid, ES. Consultado en 24 jun 2004. Disponible en [http://www.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero24\\_3.pdf](http://www.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero24_3.pdf)
12. Kubus, S.A. s.f. Elaboración de dosis seminales (en línea) Madrid, ES. Consultado en 24 jun 2004. Disponible en [http://www.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero14\\_1.pdf](http://www.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero14_1.pdf)
13. Magnum Genetics Inc. 2004. Extender (en línea) US. Consultado 25 jul 2004. Disponible en <http://www.magnumswine.com/faq/technical/extender.php>
14. Maqueda, L. 2001. Conservación de la calidad del semen: diluyentes, empaque, temperatura y transporte (en línea). Consultado 19 jun 2004. Disponible en <http://www.engormix.com/nuevo/prueba/areadeporcicultura1.asp?valor=113>
15. Minitube of North America. 2003. Standards are key to reproductive performance (en línea). Spermnotes vol VII, numero 1, US. Consultado 9 jul 2004. Disponible en <http://216.170.216-90/spermnotes/noteframe.html>.
16. Newth, S; Levis, DG. 1999. Changes in pH of boar semen extenders (en línea). Nebraska Swine Report 1999. Consultado 19 jun 2004. Disponible en <http://ianrpubs.unl.edu/swine/ec99-219.pdf>
17. Pig Improvement Company (PIC). 2003. Artificial Insemination, semen processing and quality control (en línea). Artificial Insemination technical update vol 1, numero 2, US. Consultado el 23 jul 2004. Disponible en [http://www.pic.com/usa/resources/files/AI\\_1\\_2-.pdf](http://www.pic.com/usa/resources/files/AI_1_2-.pdf)
18. Rozeboom, KJ. 2000. Evaluating semen quality (en línea). Animal science facts, North Carolina, US. Consultado 23 jul 2004. Disponible en <http://mark.asci.ncsu.edu/Publications/factsheets/812s.htm>
19. Singleton, WL. 2001. Guía básica para la recolección del semen porcino, evaluación y procesamiento (en línea). Consultado 19 jun 2004. Disponible en <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar006>
20. Swinerepronet. s.f. Gross Evaluation (en línea). Universidad de Illinois, US. Consultado 9 jul 2004. Disponible en <http://www.traill.uiuc.edu/swinerepronet/paperDisplay.cfm?Type=Both&-ContentID=6275>
21. Veliz Porras, Y; González, LA. 2003. Manual de inseminación artificial en porcinos. Guatemala, GT. 10p.

# **XI. ANEXOS**

### ANEXO 11.1

#### TABLA DE RESULTADOS DE FLUCTUACIÓN DE PH DE DILUYENTES

Fecha

Día

Lugar

Muestras -

Clave A -

B -

C -

MINUTO S	MUESTRA A		MUESTRA B		MUESTRA C	
	TUBO A1	TUBO A2	TUBO B1	TUBO B2	TUBO C1	TUBO C2
0						
10						
20						
30						
40						
50						
60						
70						
80						
90						
100						
110						
120						
130						

## ANEXO 11.2

### BOLETA DE RESULTADOS DE LABORATORIO

EVALUACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN No. \_\_\_\_\_ (1 – 4)

Fecha de la evaluación: \_\_\_\_\_ al \_\_\_\_\_

Identificación del verraco: \_\_\_\_\_

### EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

#### MACROSCÓPICA

PRUEBA	RESULTADO Antes de diluir
Volumen	
Color/ Consistencia	
Olor	
Temperatura	
pH	

#### MICROSCÓPICA

PRUEBA	RESULTADO				
	Antes de diluir	después de diluir	24 horas	48 horas	72 horas
Motilidad general					
Motilidad individual					
Aglutinaciones					
Concentración					
Determinación de vivos y muertos					

#### DOSIS PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Número de dosis

#### OBSERVACIONES

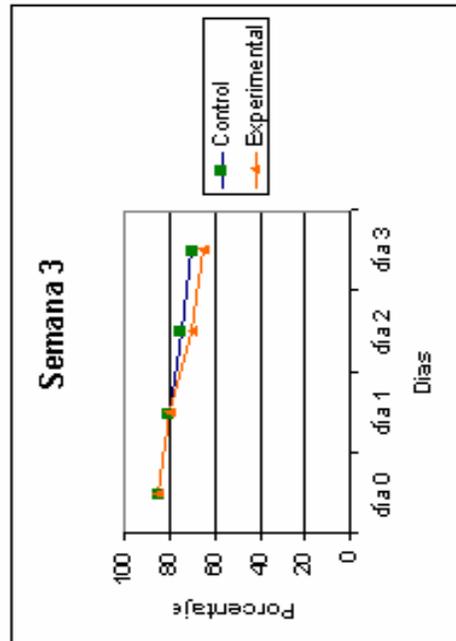
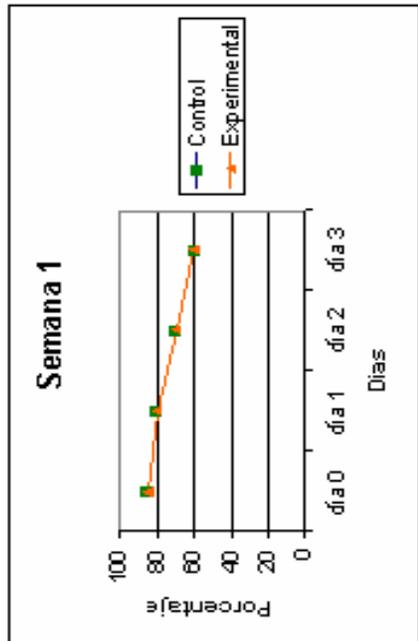
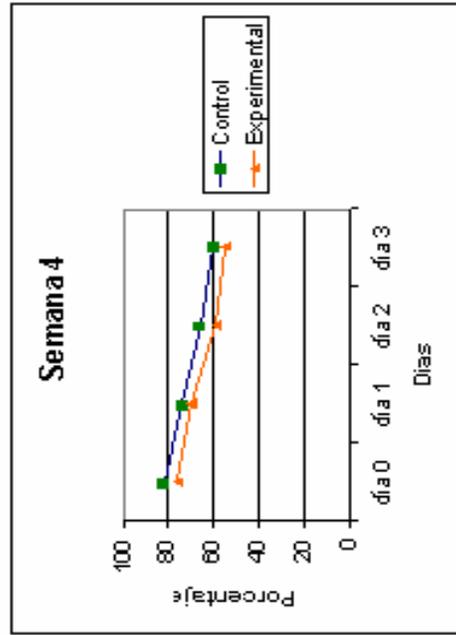
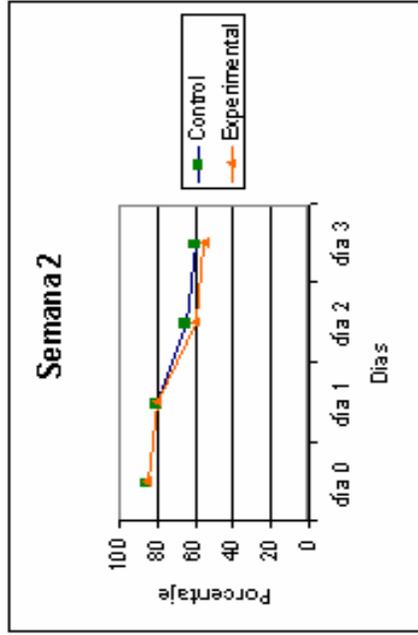
---

---

---

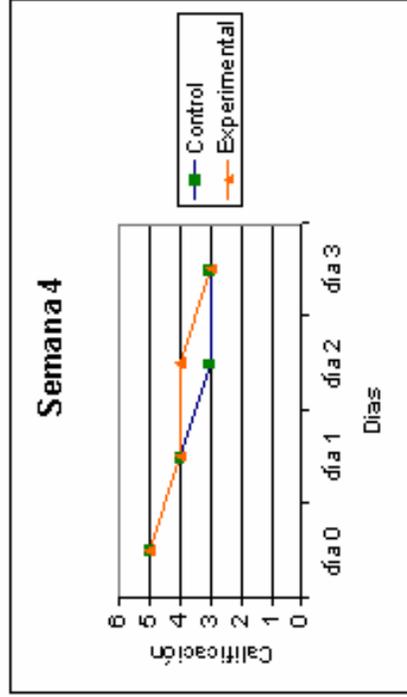
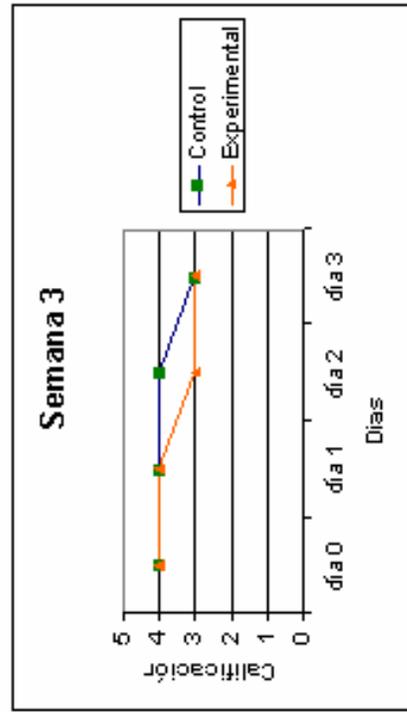
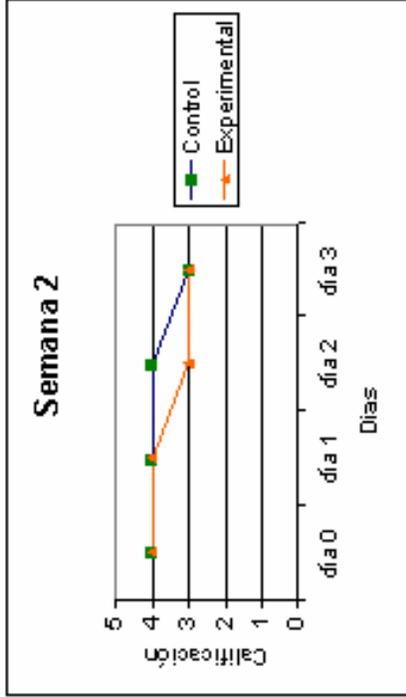
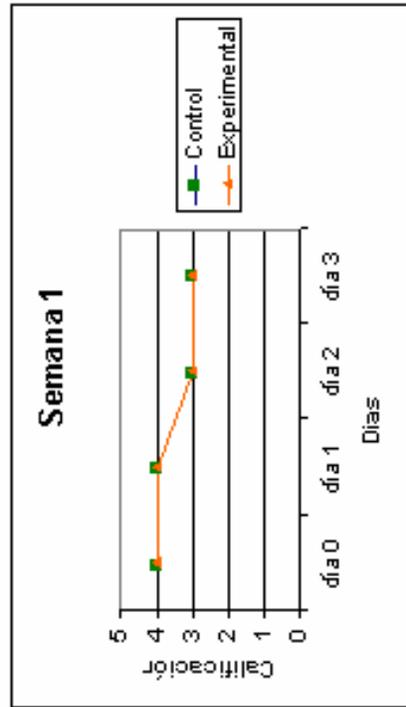
### ANEXO 11.3

#### GRAFICAS DE MOTILIDAD GENERAL



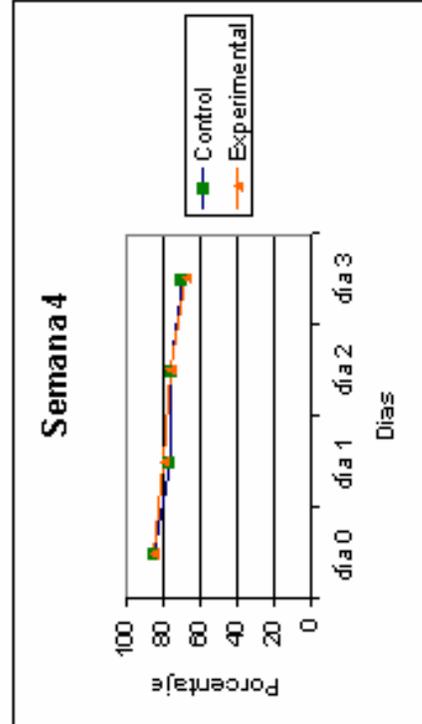
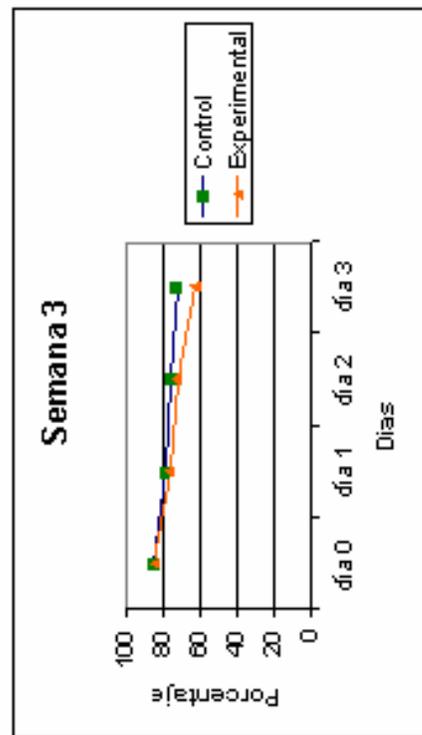
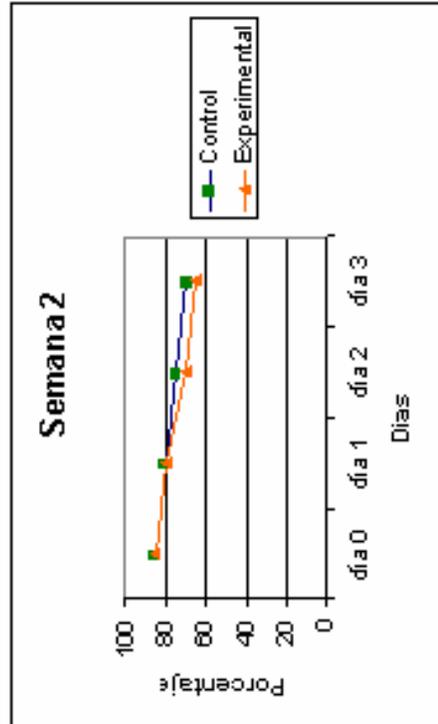
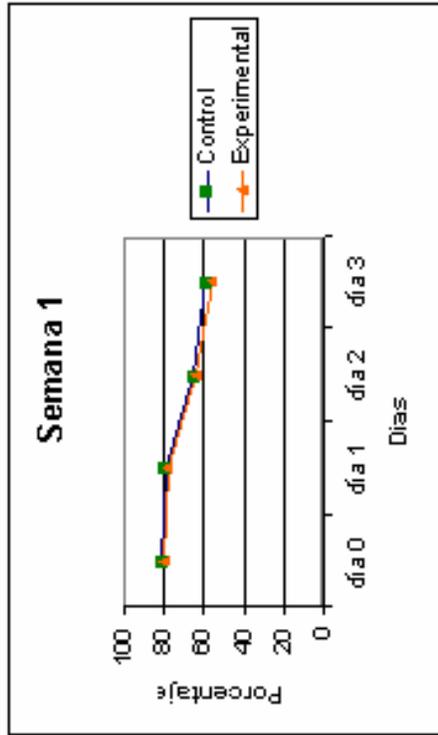
ANEXO 11.4

GRAFICAS DE MOTILIDAD INDIVIDUAL



ANEXO 11.5

GRAFICAS DE PORCENTAJE DE VIVOS Y MUERTOS



---

Br. Juan Alejandro Oliva Trejo

---

Dr. Yeri Veliz Porras  
Asesor Principal

---

Dra. Ligia Anaité González  
Asesora

---

Dr. Carlos Enrique Camey  
Asesor

Imprimase: \_\_\_\_\_  
Decano: Dr. M.V. Mario Llerena Quan