

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EFFECTO DE LA CAFEÍNA SOBRE LA MOTILIDAD DE LAS
CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN LA ESPECIE PORCINA
(*Sus scrofa*)

POR

MARIA ELENA CONTRERAS MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

MARÍN, N. L.

OCTUBRE DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EFFECTO DE LA CAFEÍNA SOBRE LA MOTILIDAD DE LAS
CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN LA ESPECIE PORCINA
(*Sus scrofa*)

POR

MARIA ELENA CONTRERAS MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

MARÍN, N. L.

OCTUBRE DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



Aprobación de la tesis

Dr. Rogelio A. Ledezma Torres
Asesor Principal

Ph.D. Emilio Olivares Sáenz
Co-asesor

Ph.D. Alejandro Sergio del Bosque González
Co-asesor

Ph.D. Rigoberto González González
Co-asesor

Ph.D. Nicasia Ineida Montes Torres
Co-asesor

Ph.D. Francisco Zavala García
Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A Dios Padre, que siempre está conmigo y me llena de fortaleza.

A mi madre, Ma. Luisa Martínez de Contreras (q.e.p.d.) por darme vida y que con su esencia e inmenso amor, me enseñó a ser lo que soy.

A mi padre, Pedro Contreras Moreno, por existir.

A mis hijos, Victor Azdrubal, Erick Alejandro y Nicolás, quienes son mi orgullo de vida.

A mis queridas nueras, Amy y Allison con cariño.

A mis nietos: Alexander, Isabella, Sofía y Víctor Enrique, mis amores, mi continuidad.

A mi hermana Adriana, carnala... ¡te quiero!

A mi familia.

A ti, que sabes el inmenso amor que te tengo.

A todos aquellos mis amigos, gracias por estar ahí siempre!

A mi Escuela, mi Alma Mater; Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León con amor y respeto.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor principal el Dr. Rogelio A. Ledezma Torres, por aceptar contribuir a la culminación de mi esfuerzo, muchas gracias.

A mis asesores y Maestros: Dra. Ineida Montes Torres, Dr. Javier Colín Negrete, Dr. Sergio Temblador Alcocer, Dr. Juan Fco. Villarreal A. Dr. Rigoberto González González, Dr. Alejandro del Bosque González, gracias por sus enseñanzas.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz, por su tiempo y paciencia al guiarme en mi trabajo de tesis y por creer en mi, gracias.

Especial agradecimiento para el Dr. Jorge R. Kawas Garza, al Ing. José Luis Martínez Montemayor y al Dr. Fernando Garza Cázares, gracias por su apoyo desinteresado, sin su valiosa ayuda nada hubiera pasado....Gracias mil.

Al C.P. Jaime R. Quintanilla Martínez, por su gran apoyo en la realización de mi trabajo, gracias.

A la Lic. Nancy T. de Alanís y Sra. Rosa Nelly Martínez González, gracias compañeras, por ser solidarias conmigo.

A todas las personas que me asesoraron y he olvidado mencionar.

A mis colegas que participaron conmigo en este proyecto de investigación.

Al Ing. Alfredo Peña López y al M.V.Z. Ernesto González Mtz., eternamente agradecida.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Hipótesis	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Inseminación artificial y conservación de semen porcino	3
2.2 Evaluación espermática	6
2.3 Características del eyaculado	7
2.3.1. Fracción pre-espermática	7
2.3.2 Fracción espermática	7
2.3.3. Fracción post-espermática	7
2.4 Evaluación práctica del semen	8
2.4.1 Volumen y color	8
2.4.2 Motilidad o movilidad	8
2.4.3 Concentración	9
2.4.4 Morfología	10
2.5 Diluyentes	10
2.6 Función del diluyente	11
2.6.1 Nutrientes	12
2.6.2 Regulación del p H	12

2.6.3 Presión osmótica	13
2.7 Tipos de diluyentes	13
2.7.1 Diluyente base (o diluyente de referencia): fórmula BTS	15
2.7.2 Diluyentes para una conservación de corta duración	15
2.7.3 Diluyentes modernos para una conservación de larga duración.	15
2.8 La Cafeína	16
2.9 Adición de lactato y cafeína al momento de la dilución.	19
2.10 Adición de lactato y cafeína a las 48 h y posterior conservación a 5°C	19
2.11 Adición de lactato y cafeína a las 48 h y posterior cultivo a 37°C.	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Ubicación	26
3.2 Sementales	26
3.3 Aprendizaje y manejo de los sementales	27
3.4 Técnica de la mano enguantada	27
3.5 Técnicas de laboratorio	28
3.6 Diseño experimental	29
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSION	35
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro1.	Parámetros establecidos para no usar dosis seminales conservadas	18
Cuadro 2.	Motilidad en las muestras adicionadas con Lactato	22
Cuadro 3.	Motilidad en las muestras adicionadas con Cafeína (BTS)	22
Cuadro 4.	Comparación de medias en motilidad (%) de las células espermáticas del cerdo de acuerdo al tratamiento y hora de exposición a la cafeína.	32
Cuadro 5.	Comparación de medias en motilidad (%) de las células espermáticas del cerdo de acuerdo al semental y hora de exposición a la cafeína.	33
Cuadro 6.	Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 12 h.	43
Cuadro 7.	Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 24 h.	43
Cuadro 8.	Comparación de medias de la motilidad de los espermatozoides después de 24 h de tratamiento con cafeína.	43
Cuadro 9.	Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 24 h.	44
Cuadro 10.	Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 36 h.	44
Cuadro 11.	Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 36 h	44
Cuadro 12.	Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 36 h.	44
Cuadro 13.	Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 48 h.	45
Cuadro 14.	Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 48 h.	45
Cuadro 15.	Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 48 h.	45
Cuadro 16.	Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 60 h.	45
Cuadro 17.	Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la	46

motilidad del semen a las 60 h.43	
Cuadro 18. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 60 h.	46
Cuadro 19. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 72 h.	46
Cuadro 20. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 72 h.	46
Cuadro 21. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 72 h.	47
Cuadro 22. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 84 h.	47
Cuadro 23. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 84 h.	47
Cuadro 24. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 84 h.	47
Cuadro 25. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 96 h.	48
Cuadro 26. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 96 h.	48
Cuadro 27. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 96 h.	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diluyentes agrupados por la duración	14
Tabla 2. Motilidad de células con o sin adición de cafeína (diluyente BTS)	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema molecular de la cafeína (se omiten algunos átomos de carbono y de hidrógeno)	17
Figura 2. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen equino almacenado a 5°C lactato y cafeína incorporados al momento de la dilución.	19
Figura 3. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen equino almacenado a 5°C lactato y cafeína incorporados luego de 48 h en heladera.	20
Figura 4. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen equino cultivado a 37°C previo almacenaje de 48 h a 5°C con lactato y cafeína incorporados luego de este período.	21
Figura 5. Valores (promedios \pm Desviación estándar) de la motilidad (s) del espermatozoide de trucha arcoíris, obtenidos con diferentes concentraciones de cafeína.	24
Figura 6. Valores (promedios \pm Desviación estándar) de la fertilidad (%) del espermatozoide de trucha arcoíris, obtenidos con diferentes concentraciones de cafeína.	24
Figura 7. Comparación de medias de motilidad (%) de células espermáticas del cerdo, según tratamiento y a diferentes tiempos.	32
Figura 8. Motilidad (%) de los espermatozoides de acuerdo al tratamiento de cafeína (T1=Con cafeína desde las 0 h T2=Con cafeína aplicada a las 48 h y T3=Testigo) en función del tiempo.	33
Figura 9. Motilidad espermática del semen de los tres sementales (S1, S2, S3) en función del tiempo.	34
Figura 10. Motilidad espermática del semen de los tres sementales (S1, S2, S3) en función del tiempo.	34

RESÚMEN

Una dificultad en el manejo de semen para la Inseminación Artificial en porcinos, es precisamente el control de la conservación de las células espermáticas, ya que hay que considerar la composición del plasma seminal. En el presente trabajo con la incorporación del diluyente (BTS) al eyaculado recuperado de tres sementales porcinos (en monta artificial con la técnica de la mano enguantada) y con la adición de cafeína en su función capacitadora sobre los espermatozoides, se provocó una mejor motilidad, ayudando a la supervivencia espermática. Haciendo evaluaciones de la motilidad a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h, siendo los tratamientos con cafeína, adición de cafeína a las 48 h y sin cafeína, el agregado de cafeína fue de 10 mM y se mantuvo en una heladera a 17° C. Se observó su actividad espermática hasta los 96 h.

Se encontró diferencia significativa en la motilidad del semen entre los tratamientos de cafeína y entre los sementales, también se observó diferente motilidad a través del tiempo (12 a 96 h).

Los resultados mostraron que no hubo interacción entre sementales y tratamientos, por lo que las diferencias entre los tratamientos de cafeína son independientes de la motilidad del semen presentada en cada semental; es decir que la motilidad del semen se incrementa con la adición de cafeína en sementales con alta o baja motilidad del semen.

I. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial es una técnica de manejo reproductivo utilizada desde hace muchos años en los sistemas de producción pecuaria. El esperma eyaculado por los sementales, ya sea fresco, refrigerado o congelado, en el caso de las granjas porcinas, es inseminado en las cerdas para fertilizar los óvulos, debiéndose considerar con esto, el mejoramiento genético de la granja.

Para mejorar los parámetros de un programa de inseminación artificial, hay que considerar aspectos que van desde el manejo, la alimentación, la sanidad, además de la obtención y conservación del semen eyaculado. Un aspecto de manejo que impacta importantemente en la calidad del semen es la selección apropiada de los sementales donadores. La motilidad espermática es una variable que refleja la vitalidad del eyaculado en función de la cantidad de células en movimiento. Sementales que tienen semen con espermatozoides anormales o dañados, generan gran cantidad de sustancias oxidantes, las cuales dañan al eyaculado.

Existen tratamientos, entre ellos el uso de vitaminas y minerales, que mejoran durante un corto tiempo, la libido y la calidad seminal del cerdo. Por otro lado, es posible incrementar el movimiento de las células espermáticas con la adición de estimulantes como el lactato de sodio y la cafeína, al momento de diluir el semen, mejorando la capacitación, y consecuentemente, la fecundación. La cafeína y el lactato de sodio pueden resultar de utilidad práctica para mejorar la conservación del semen de cerdo refrigerado o congelado, mejorando su vigor motriz, al actuar como activador de las células espermáticas.

1.1 Objetivos.

Evaluar el efecto de la adición de la cafeína diluida en BTS (Betsville Thawing Solution) sobre la motilidad de las células espermáticas de cerdo en diferentes tiempos (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72,84 y 96h.).

1.2 Hipótesis.

Al agregar cafeína diluida en BTS, se obtendrá un aumento de la motilidad, vigor y resistencia de los espermatozoides.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Inseminación artificial y conservación de semen porcino.

En la actualidad, la Inseminación Artificial (I.A.) porcina es una técnica reproductiva de amplia aplicación en todo el mundo desarrollado. Sin embargo, el grado de utilización en los diversos países es muy variable. En los países europeos de nuestro entorno, la aplicación de la inseminación artificial es muy elevada, superando en muchos países el 80% de las reproductoras (Holanda, Francia, Alemania, España, Noruega, Finlandia, etc.). Por el contrario, en los Estados Unidos el porcentaje de utilización de la inseminación artificial es aún reducido (del orden del 50%), aunque en los últimos años se ha producido un incremento muy destacable. Según las últimas estimaciones, la práctica total de las inseminaciones (99%) se realiza con semen refrigerado a 15–20°C.

El uso de semen congelado queda hoy día limitado a casos muy específicos, o bien asociado a la introducción en las explotaciones de nuevo material genético de alto valor para inseminar determinados animales puros en las granjas de selección, o asociados a labores de investigación. Sin embargo, el uso de semen congelado puede hoy en día aportar ciertas ventajas sobre el semen refrigerado como son el transporte a largas distancias o la conservación durante un tiempo muy prolongado (años) con unos resultados productivos que progresivamente mejoran y se acercan a los obtenidos con semen refrigerado (Gadea *et al.*, 2004).

Un método alternativo para la obtención del eyaculado del cerdo, es el método de la mano enguantada. El equipo necesario es un guante de plástico y un recolector compuesto por un termo de boca ancha, con una gasa sujeta con ligas en la entrada, el cerdo es estimulado a realizar la monta como si fuera a usarse la vagina artificial (Colenbrander y Kemp, 1990). Sorensen (1979) y Ergo (2007) consideraron que el método más práctico para la colección de semen es el “método de la mano enguantada”.

Este método consiste en agarrar y estimular manualmente el pene del verraco.

Previo a la colección de semen, la vaina prepucial debe exprimirse para limpiarla de contenidos de orina y mucus. Para esta operación se debe utilizar el sobre-guante higiénico, para evitar la contaminación del guante de colección con secreciones prepuciales u otro tipo de impurezas. Después de completar los preparativos higiénicos, se retira y descarta el sobre-guante.

Tan pronto como el verraco inicie la protrusión del pene, el colector debe agarrarlo dejando libre unos 2 ó 3 centímetros de su extremo, a fin de evitar que el eyaculado escurra sobre el guante, la aprehensión debe ser lo suficientemente fuerte para evitar la rotación del pene; así la erección completa del pene debe de ocurrir al adecuado estímulo manual. Nunca traccione el pene. Al iniciarse la eyaculación, los primeros chorros deben limpiar la uretra y no deben de colectarse, ya que es líquido seminal.

El eyaculado se compone de cuatro fases:

1. Secreciones uretrales: las secreciones uretrales son los primeros chorros, cuya función es la limpieza de la uretra. Son transparentes y no contienen células espermáticas.
2. Fase rica en semen: de aspecto lechoso, contiene aproximadamente 70% de las células espermáticas del volumen eyaculado.
3. Fase pobre en semen: de aspecto entre transparente y lechoso, contiene menor cantidad de espermatozoos y puede ser observada alternando con la fase rica en semen.
4. Secreción gelatinosa: generalmente hacia el final de la eyaculación. El gel debe descartarse.

El tiempo de colección puede variar de 5 a 15 minutos, siendo su término determinado por la retracción espontánea del pene. Descarte la porción superior desprendida con el filtro que contiene la secreción gelatinosa. Terminada la colección, el eyaculado debe ser llevado inmediatamente al laboratorio para su evaluación y dilución. Durante la evaluación y hasta la dilución el eyaculado debe mantenerse a una temperatura constante, entre +30° C y 34° C.

Aunque las contracciones uterinas poseen indudablemente gran importancia en el transporte rápido de las células espermáticas, en la mayor parte de las especies, no deben considerarse carentes de importancia en el proceso reproductivo, otros mecanismos de transporte de espermatozoides. La inseminación suele ocurrir varias horas antes de la ovulación y la velocidad del transporte de espermatozoides quizá sea menos importante para los índices de concepción y fecundación que el número de los mismos en el área de fecundación a nivel de la ampolla del oviducto.

Como factores adicionales que influyen en el transporte de espermatozoides cabe incluir su movilidad, presión intrauterina negativa, movimientos de líquidos genitales, predisposición de los espermatozoides para reotaxis (orientación a contracorriente), movimientos siliares en el oviducto y volumen y concentración de células espermáticas en la dosis inseminada. El volumen del semen tiene influencia en la proporción de las hembras en las que el esperma llega a los oviductos mientras que la concentración de las células afecta el número de estas en los oviductos. (Colenbrander *et al.*, 1993).

La colección del semen de verraco, requiere de un procedimiento totalmente diferente. Durante el servicio natural, el verraco eyacula, cuando el glande en forma de espiral se encuentra encerrado dentro del cervix de la cerda. La presión de este encierro estimula la eyaculación. Si se utiliza una vagina artificial para coleccionar el semen del verraco, debe estar diseñada de tal manera que el pene reciba una presión adecuada. A medida que el glande sale del prepucio se aplica una presión continua para estimular la eyaculación, lo cual puede durar de 10 a 20 minutos. La eyaculación se interrumpe si no se obtiene la presión deseada para el estímulo. (García *et al.*, 1994).

2.2 Evaluación espermática

Los espermatozoides de los mamíferos, están formados básicamente por dos zonas, con distintas funciones, la cola y la cabeza, la cola se divide en tres segmentos, que, por orden cráneo-caudal se denomina parte principal, intermedia y caudal (Quintero, 2003).

El núcleo de la cola, está formado por un axonema eucariota típico, con una estructura radial, de pares de micro-túbulos, la parte intermedia como la principal contienen una serie de elementos semi-rígidos, cuya función es otorgar direccionalidad y flexibilidad al movimiento, flagelar; la parte intermedia contiene también la mitocondrias, cuya función es la de generar la energía necesaria para el movimiento del axonema, todo esto genera que la cola presente un patrón de movimiento rotacional y elíptico, el cual se transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello el movimiento rotacional subsidiario de la cabeza, es el que otorga la progresividad del movimiento. Como consecuencia de la actividad metabólica del espermatozoide, se produce ácido láctico que disminuye el pH del medio, esto a su vez provoca un efecto inhibitorio del metabolismo energético y de la motilidad (Quintero, 2003).

En la historia cronológica relacionada con la adición de la cafeína al semen se encontró que en 1949, el Dr.C.Polge en Cambridge, utilizó por primera vez el glicerol, en 1970, junto a Salomón e Ian Wilmut, usan la deposición de semen congelado a nivel uterino (cirugía) en 1971, Crabo y Einarsson y et al.,obtienen las primeras camadas así como Watson y Holt en 1990, dieron las bases de la crioconservación y particularidades del proceso; observaron la limitación del uso de semen congelado, debido al proceso de congelación –descongelación y la limitación del uso de semen fresco, debido a muerte de células por shock térmico y la falta de nutrientes al espermatozoide y el uso de semen refrigerado mantenido a 17 grados con diluyentes que lo mantienen hasta 7 días. (Colenbrander *et al.*, 1993).

2.3 Características del eyaculado

La eyaculación en los cerdos es de larga duración, de 10-15 minutos. Durante el proceso, el total del eyaculado se divide en tres fracciones bien determinada.

2.3.1. Fracción pre-espermática

Está constituida por las secreciones de las glándulas accesorias, principalmente de la próstata, vesículas seminales y algunos grumos procedentes de la glándula de Cowper, que comúnmente se conocen como tapioca. Esta fracción es transparente sin espermatozoides, con alto contenido de bacterias y tiene un volumen aproximado de 10 ml. Rillo (1982); Colenbrander *et al.*, (citado por Cordova, 1993).

2.3.2 Fracción espermática

También se le llama fracción rica en espermatozoides, es de color blanco lechoso, constituida principalmente de espermatozoides y secreciones de las vesículas seminales y de la próstata. Su volumen está entre 30-40 a 90-100 ml. dependiendo de factores como: estación del año, duración del día, temperatura ambiente, medio ambiente social, nutrición, raza, edad y tamaño de los testículos. Rillo (1982); Colenbrander y Kemp (1990), citado por Córdoba, 2006).

2.3.3. Fracción post-espermática

A esta fracción también se le llama fracción pobre en espermatozoides, está constituida por las secreciones de la próstata y glándulas de Cowper (tapioca), principalmente al final de la fracción. Es de color blanquecino transparente con abundantes grumos de tapioca, con volumen de 200 ml o más. Esta fracción puede estar intercalada de fracciones ricas en espermatozoides, sobre todo cuando se presentan interrupciones en la eyaculación Rillo (1982); (citado por Córdoba, 2006).

2.4 Evaluación práctica del semen

La evaluación seminal es fundamental y ayuda a evitar problemas de fertilidad en los verracos, las características de volumen del eyaculado, color, concentración de espermatozoides (número/ml), motilidad y morfología espermática deben ser analizadas de manera rutinaria y práctica, inmediatamente después de la recolección Colenbrander y *et al.*, (1990); (citado por Córdova I, 2006).

2.4.1 Volumen y color

En una primera valoración se observan las características macroscópicas del eyaculado. Se mide el volumen utilizando para ello en probetas o bolsas plásticas graduadas, se observa si el color blanco lechoso es normal o está mezclado con otros colores como marrón, rojizo o amarillento y olores anormales, lo cual puede ser debido a alteraciones patológicas del aparato reproductor o a la contaminación con orina durante la eyaculación.

2.4.2 Motilidad o movilidad

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

0. Inmóviles o muertos.
1. Girando entre sí, sin movimiento progresivo.
2. Movimientos anormales, en ocasiones progresivo.
3. Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
4. Con movimientos progresivo rápido.
5. Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido.

Existen otros métodos más sofisticados para la evaluación del semen y están apoyados en sistemas eléctricos y técnicas fotoeléctricas. En la actualidad, estas técnicas de valoración seminal están conectadas a computadoras y de los cuales se obtienen varios indicadores del movimiento espermático como: velocidad, tipo de movimiento, trayectoria recorrida, desplazamiento angular, entre otros. Estas técnicas son llamadas comúnmente como sistemas de análisis espermático asistido por computadora, CASA (computer-assisted semen analysis). Sin embargo, estos sistemas tienen inconvenientes al utilizarlos con los espermatozoides de verraco por su alta variabilidad en función de la temperatura, actividad inhibitoria del plasma seminal y la concentración espermática (Martin, 1982).

2.4.3 Concentración

Es la determinación del número de espermatozoides por unidad de volumen en el eyaculado. La valoración de este parámetro es fundamental, ya que junto con el volumen del eyaculado, determinan el número de dosis seminales para la I.A.. Se emplean varios métodos, sin embargo, desde el punto de vista práctico, la técnica que aquí se describe es muy útil. La técnica se denomina Recuento Directo, en la cual se utiliza un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y una pipeta de Thomas para glóbulos rojos. La solución utilizada para la inmovilización de los espermatozoides está compuesta de citrato de sodio y formol al 3% en diluciones con el esperma de 1:200 ó 1:100. El conteo se realiza directamente en el microscopio contando los espermatozoides de cinco cuadros grandes del rayado de la cámara en ambos lados. Las frecuencias en las eyaculaciones tienen un efecto significativo sobre las características del semen, tales como el volumen del eyaculado y la concentración de espermatozoides por ml, la producción diaria de espermatozoides puede ser estimada mediante la recolección del semen de un verraco tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes, por ejemplo) y calculando la producción de 5 y 6 semanas consecutivas. Un método más práctico es estimando la capacidad de producción de espermatozoides mediante una frecuencia intensiva de recolección del semen, por ejemplo cada dos h, seguido por una recolección diaria por cuatro días (Colenbrander and Kemp, 1990).

2.4.4 Morfología

La evaluación morfológica de los espermatozoides a través del microscopio se considerada como una excelente contribución a la predicción de la fertilidad de los verracos. Un eyaculado normal no debe contener más del 10% de espermatozoides con alguna anormalidad, lo cual debe ser valorado rutinariamente después de la recolección y antes de preparar las dosis para I.A., para ello se emplean técnicas de tinción totales que nos permiten observar el aspecto general de los espermatozoides (García *et al.*, 1994).

La presencia de gotas citoplásmicas se corresponden con gametos que no han completado el proceso de maduración espermática en el que hay una pérdida del material citoplasmático. Estas gotas se clasifican en proximales y distales en relación a su proximidad a la cabeza espermática. Esta alteración morfológica es la más frecuente de las encontradas (Gadea *et al.*, 1998) y su presencia indica una falta de adaptación entre la producción espermática y el ritmo de recogida.

La cola en látigo y la cola en ovillo tienen su origen en el tránsito por el epidídimo (Holt, 1982). La frecuencia de aparición de estas alteraciones suele ser reducida, sin embargo tienen una gran importancia funcional, ya que imposibilitan el movimiento progresivo del espermatozoide.

Se han descrito un gran número de alteraciones de la forma y tamaño de la cabeza, entre las que se encuentran, micro- y macro-cefalia, cabezas redondeadas, piriformes, etc. El origen de estas malformaciones es tipo primario, es decir de origen testicular, sin embargo no está bien aclaradas las causas que llevan a la formación de estas alteraciones morfológicas. (Martín, 1982).

2.5 Diluyentes

Las peculiares particularidades que presenta el espermatozoide porcino hace que sea muy sensible al shock por frío (Pursel *et al.*, 1973a), que produce una alteración de la viabilidad espermática. En concreto la composición lipídica de sus membranas parece ser la responsable de esta situación. Así, cuando se reduce la

temperatura, los movimientos laterales de los fosfolípidos que componen la membrana se ven reducidos y se producen separaciones de fases lipídicas, situación asociada a alteraciones irreversibles de las proteínas de las membranas. Todo hace que se altere la funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se vea comprometida (White, 1993). Esta susceptibilidad al choque por frío, supone en la práctica que las muestras seminales deban ser conservadas a 15-20°C, ya que una reducción en la temperatura de almacenamiento limita la viabilidad de las muestras seminales.

La conservación a estas temperaturas moderadamente reducidas limita la capacidad de almacenamiento de las muestras. Por una parte, porque no puede reducirse el metabolismo celular y por otra porque no pueden controlarse las condiciones microbiológicas con la misma efectividad de temperaturas inferiores (5°C). (Paulenz *et al.*, 2000).

Por otra lado, el efecto de dilución lleva a que determinados compuestos presentes en el plasma seminal estén en muy bajas concentraciones en el semen diluidos y alteren la viabilidad espermática, como por ejemplo la reducción de la concentración de K⁺ (Potasio) (Harrison *et al.*, 1978), o de proteínas plasmáticas. Estas pérdidas deben compensarse con la adecuada formulación del diluyente, así por ejemplo la adición de albúmina sérica bovina (BSA), ya que se ha demostrado que esta adición estimula la motilidad y mejora las tasas de fertilidad del semen conservado (Waberski *et al.*, 1994a).

2.6 Funciones del diluyente

Para llevar a cabo su misión el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (con glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (Bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos).

2.6.1 Nutrientes

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

2.6.2 Regulación del pH

El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a 7.4 ± 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 (con el carbohidrato principal es glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como índice de calidad seminal (Rigau *et al.*, 1996).

La adición de agentes tamponeadores 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 (TES, HEPES, MOPS, TRIS) pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (MOPS y HEPES).

El pH de los diluyentes normalmente utilizados oscila entre 6.8 y 7.2 pero se debe de tener en consideración que el pH de estos medios no se estabiliza hasta pasado unos 60-90 minutos del inicio de la dilución en agua y que los distintos diluyentes presentan un diferente patrón de cambio de su pH a lo largo del tiempo (Newth y Levis, 1999). Por lo que se han de tomar las medidas oportunas en el proceso de preparación de los diluyentes antes de su uso, para evitar problemas en el proceso de conservación.

2.6.3 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 espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm (Fraser et al., 2001), mientras que cuando se reduce por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad (Gilmore et al., 1996, Fraser *et al.*, 2001).

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

2.7 Tipos de diluyentes

A nivel práctico en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación a corto plazo (menos de 1-3 días), o aquellos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de 4 días) (Tabla 1). Los primeros se utilizan principalmente en estructuras de distribución de las dosis seminales a corta distancia (propias de los sistemas europeos, donde la producción de dosis seminales en la misma granja es frecuente) mientras que los de largo plazo son propios de estructuras como las presentes en los USA o Noruega donde la distancia entre el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado es grande.

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

recogida seminal y facilita en gran medida la distribución de las muestras a las granjas de reproducción.

Los primeros diluyentes rusos estaban basados en soluciones de glucosa con tartrato de sodio o potasio o sulfato sódico y peptonas, manteniendo en cualquier caso bajos niveles de electrolitos. Posteriormente en la década de los 50, se produjo el desarrollo de los diluyentes para el ganado bovino, basados en yema de huevo con fosfato o citrato y leche, y se hicieron algunas adaptaciones para conservar semen porcino. De entre todos, cabe destacar la adaptación del diluyente Illinois Variable Temperature que se utilizaba para la conservación de semen en el ganado vacuno a temperatura ambiente. Este IVT medio está basado en una solución de glucosa, citrato, bicarbonato y yema de huevo, pero necesitaba ser gaseado con CO₂ para reducir la actividad metabólica

En la década de los 60, se produce una gran innovación consistente en la adición de un agente quelante (EDTA), que permitiría bloquear la acción del calcio como mediador de los procesos de capacitación y reacción acrosómica. Es cuando aparece el diluyente Kiev, que posteriormente ha sido modificado y recibido otras denominaciones (EDTA, Merck I, Plisko, Guelph). Este medio Kiev permitió una amplia difusión de la IA porcina y todavía sigue utilizándose con éxito en nuestros días. (Gadea y *et al* 2004).

Tabla 1. Diluyentes agrupados por la duración

Corta duración (1-3 días)	Larga duración (más de 4 días)
Beltsville Liquid (BL-1)	Acromax®
Beltsville Thawing Solution (BTS)	Androhep®
Illinois Variable Temperature (IVT)	Modena
Kiev	MR-A®
Vital®	MULBERRY III®
	Reading
	X-Cell®
	Zorlesco
	Zorpva

Fuente: Gadea, et al 2004.

A nivel mundial existen varios tipos de diluyentes y numerosos métodos de dilución, sin embargo, algunos principios básicos permiten clasificarlos en varias categorías.

2.7.1 Diluyente base (Beltsville Thawing Solution): fórmula BTS.

Fórmula ideada por el Dr. V.G. Pursel en Estados Unidos, constituye una fórmula de base que, si bien actualmente ha quedado un poco antigua, nos permite explicar el papel de un diluyente a través de sus componentes:

- a) Glucosa: aporta la energía indispensable para la supervivencia del espermatozoide.
- b) Citrato de sodio, bicarbonato de sodio y cloruro de potasio: aporte mineral para garantizar el equilibrio físico-químico (pH, equilibrio iónico).
- c) EDTA: anticoagulante que permite evitar la aglutinación y la precipitación de los espermatozoides en el diluyente.
- d) Antimicrobiano: garantiza que no proliferen las bacterias durante la conservación.

2.7.2 Diluyentes para una conservación de corta duración.

Del tipo de la fórmula BTS pero con variantes, se utilizan generalmente para conservaciones no superiores a 48 h con semen refrigerado.

2.7.3 Diluyentes modernos para una conservación de larga duración.

Son diluyentes complejos que permiten conservaciones de 5 a 6 días con ciertas exigencias particulares relacionadas con:

1. La fracción a recoger: en general la fracción rica.
2. Un tipo de dilución de 1/10 a 1/15 con agua destilada.
3. Un control muy elevado de la contaminación bacteriana con un antimicrobiano no espermicida.
4. Una refrigeración progresiva por etapas para alcanzar 15-17°C con una variación mínima de temperatura.

2.8 La Cafeína

Así mismo la cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas (a la que también pertenecen la teofilina del té, la teobromina del chocolate, la guaranina del guaraná, la mateína del mate y también la kola y el yopo) cuyo consumo tiene efectos estimulantes sobre el sistema nervioso autónomo (estimula el estado de vigilia y la resistencia al cansancio) y sobre el corazón (provoca vasodilatación). En humanos resulta muy útil para el tratamiento de ciertos tipos de cefaleas, asma bronquial y cólicos de la vesícula biliar, pero su abuso produce arritmia cardíaca, insomnio y dolor de cabeza. No se considera una droga en sentido legal, ni tampoco una sustancia psicotrópica, pero sí produce un síndrome de abstinencia y posee una actividad unas diez veces menor que la cocaína aunque no funciona a nivel bioquímico sobre los mismos receptores que ésta. Es un ingrediente principal o accesorio de numerosos medicamentos, y su tolerancia es muy alta y se establece muy rápidamente.

La cafeína se encuentra principalmente en los frutos de la planta de café, en la planta de té, en la hierba mate, y en las bayas de guaraná. En pequeñas cantidades se puede encontrar en el cacao y en la nuez de kola. En general, la cafeína se encuentra en las semillas, hojas, y frutos de más de 60 plantas, en las que actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertas clases de insectos cuando se alimentan de éstas.

La cafeína es un estimulante del sistema nervioso autónomo que puede quitar la somnolencia y restaurar el nivel de alerta. Las bebidas que contienen cafeína, como el café, té, refrescos de cola y bebidas energéticas tienen una gran popularidad: la cafeína es la sustancia psicoactiva más ampliamente consumida en el mundo. En Norteamérica, el 90% de los adultos consumen cafeína todos los días. (Wilmore et al; 2007)

Propiedades químicas

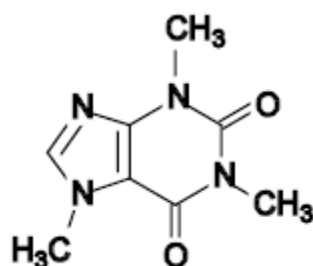


Fig.1 Esquema molecular de la cafeína (se omiten algunos átomos de carbono y de hidrógeno)

La cafeína es un alcaloide de la familia metilxantina, que también incluye los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar. En estado puro es un polvo blanco muy amargo. Fue descubierta en 1819 por Ruge y descrita en 1821 por Pelletier y Robiquet.

Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1, 3, 7-trimetilxantina o 3,7-dihidro-1,3, 7-trimetil-1H-purina-2,6-diona y su estructura puede verse en la figura 1.

En un estudio realizado con cafeína adicionada en el reconstituyente de semen congelado bovino (pellets), no resultó efectiva (Wilde *et al.*, 1989; 1990). En tanto que su utilización en los diluyentes previo a la criopreservación dio resultados positivos con el agregado de 10 mM, no así con 6 mM (Wilde *et al.*, 1996; de la Vega *et al.*, 1997).

Cuando se añadió cafeína ó pentoxifilina al semen a 2.5, 5, ó 10 mM, no se vio efecto significativo en la movilidad de los espermias del pavo, sin importar si estos componentes habían sido añadidos a semen no almacenado, estuvieron presentes durante 6 h de almacenamiento, o si habían sido añadidos después del periodo de 6 h de almacenamiento. Estos estudios demuestran que la movilidad de los espermias y capacidad de fertilización de semen de pavos criados en grupo disminuye con el

almacenamiento, y que la adición de cafeína o pentoxifilina ya sea durante o después del almacenamiento, no afecta la movilidad de los espermias. (Parkhurst *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta que en el espermatozoide porcino, se requiere la presencia de acrosoma intacto, luego de la capacitación para completar el proceso de fertilización, la cafeína podría ser utilizada, como agente capacitante, solo a bajas concentraciones, considerando al bicarbonato 40 mili Moles (mM) y a la adenosina 10 mM, como inductores óptimos de la capacitación, se sugiere la utilización de la adenosina, 10 mM, para optimizar la capacitación en el espermatozoide porcino críoconservado. (Breininger *et al.*,2003).

Rillo *et al.* citado por Herrera (2000) determinaron una serie de parámetros a partir de los cuales no recomiendan el uso de dosis seminales diluidas y conservadas (cuadro 1).

Cuadro1.Parámetros establecidos para no usar dosis seminales conservadas			
Parámetro	24 hrs.de conservación	48 hrs.de conservación	72 hrs. de conservación
Mot.sin cafeína	-10%	-10%	0
Mot.con cafeína	20%	-10%	0
Acrosomas normales	-30%	-30%	-30%
Colas anormales	>40%	>40%	>40%
Gota citoplasmática			
Proximal	>50%	>50%	>50%
Gota citoplasmática			
Distal	>80%	>80%	>80%

Fuente: Rillo *et al.*, citado por Herrera (2000)

Así mismo, Wilde *et al.* (2004) obtuvieron los siguientes resultados, probando el efecto de la adición de la cafeína y lactato sobre la motilidad del semen equino diluido en leche descremada –glucosa.

2.9 Adición de lactato y cafeína al momento de la dilución.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2. Existe una marcada diferencia, estadísticamente significativa, entre las formulaciones conteniendo lactato y cafeína respecto a la muestra extendida con Diluyente Base (DB) solo, induciendo éstas movimientos espermáticos más vigorosos desde el inicio de la dilución. Este levantamiento de la motilidad se prolonga significativamente en el tiempo.

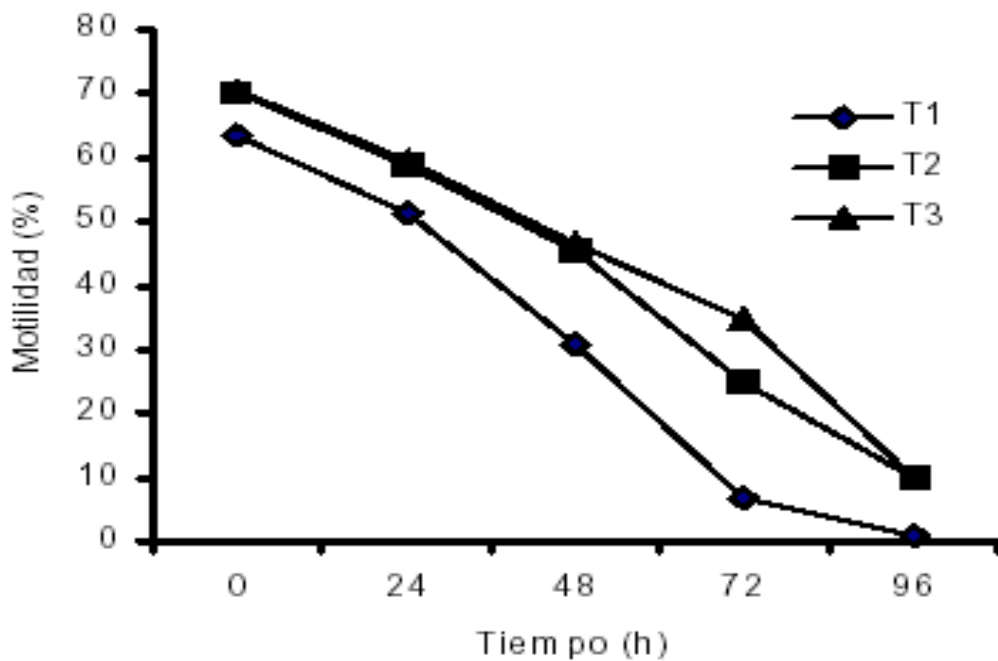


Figura 2.- Porcentaje de espermatozoides móviles en semen equino almacenado a 5°C lactato y cafeína incorporados al momento de la dilución.

Fuente: Wilde, O.R., et al 2004.

2.10 Adición de lactato y cafeína a las 48 h y posterior conservación a 5°C

El semen diluido en DB (T1) presentó en el experimento de Wilde; et al, al inicio del almacenamiento a 5°C, entre un 60 y un 70% de espermatozoides móviles para los tres padrillos en estudio. A las 48 h el porcentaje de espermatozoides móviles había decaído aproximadamente al 30% con pérdida manifiesta del vigor. La adición, tanto de lactato (T4) como de cafeína (T5) produjo en este punto una notable recuperación del número de espermatozoides en movimiento con una elevada proporción de espermatozoides moviéndose vigorosamente. En la Figura 3. Se pueden observar las curvas desde el momento de la dilución. Existen diferencias significativas a favor de las muestras con cafeína.

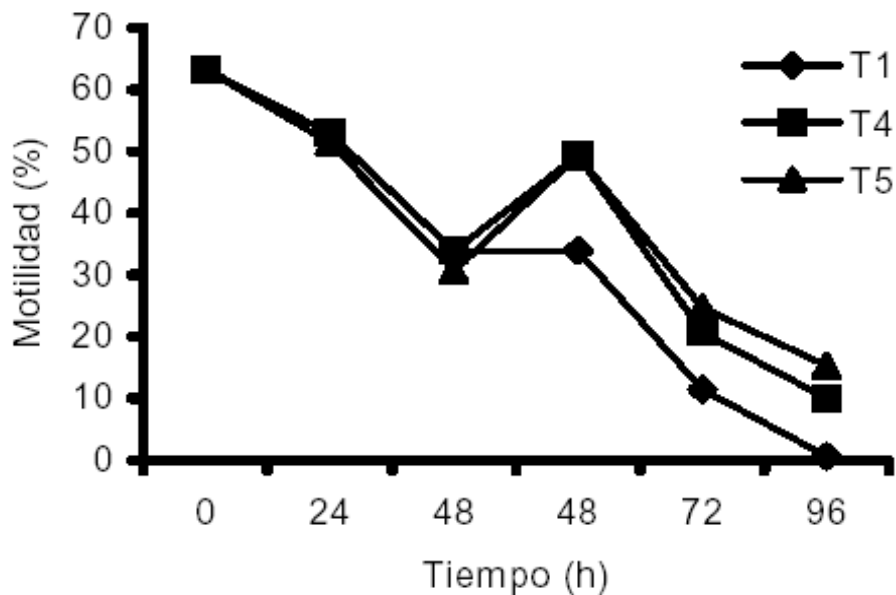


Figura 3. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen equino almacenado a 5°C lactato y cafeína incorporados luego de 48 h en heladera.

Fuente: Wilde, O.R., et al 2004.

2.11 Adición de lactato y cafeína a las 48 h. y posterior cultivo a 37°C.

Siguiendo con lo registrado por Wilde.,et al (2004) los resultados se presentan en la Figura 4. Cuando a las 48 h se incubaron alícuotas de 2 ml de semen a 37°C, con o sin lactato o cafeína adicionados, los espermatozoides acondicionados en DB presentaban, a los 30 minutos de incubación, un pobre porcentaje de espermatozoides móviles (5%), para decaer aún más durante los 30 minutos siguientes. Se registraron diferencias significativas con el testigo, en tanto que entre los aditivos estudiados fue superior significativamente la cafeína ($P < 0.01$).

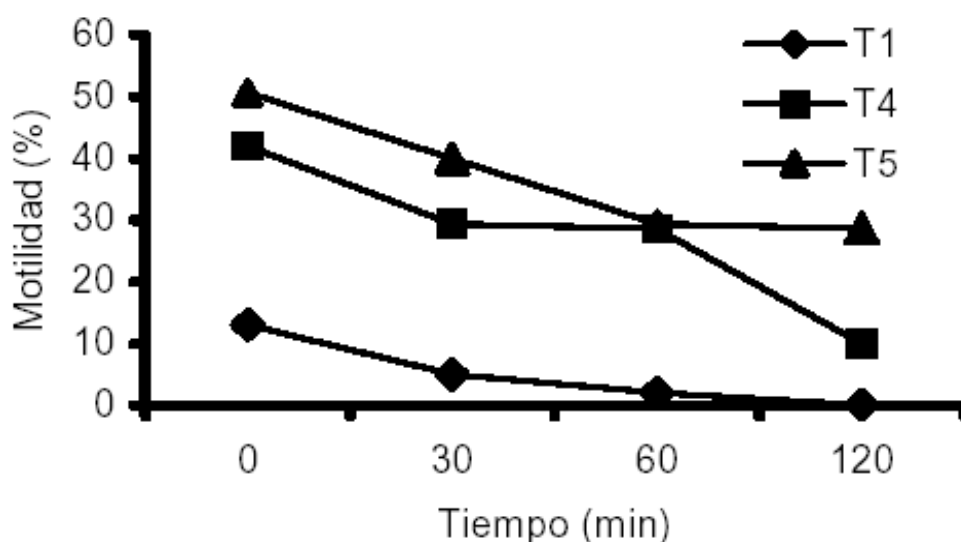


Figura 4. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen equino cultivado a 37°C previo almacenaje de 48 h a 5°C con lactato y cafeína incorporados luego de este período.

Fuente: Wilde, O.R., et al 2004.

Comparando los tratamientos en base al momento de la incorporación de los aditivos (T2 vs. T4 y T3 vs. T5), Wilde., et al (2004) obtuvieron los resultados observados en los cuadros 2 y 3, no se registraron diferencias estadísticamente significativas, salvo en el caso del diluyente con cafeína a las 72 y 96 h de almacenaje, en el primer caso a favor del T3 y en el segundo del T5.

Cuadro 2. Motilidad en las muestras adicionadas con Lactato.			
Tratamiento	48	72	96
-----%-----			
T2	45ns	25ns	10ns
T4	49ns	21ns	10ns
‡T2: DB con Lactato, incorporado al momento de la dilución. T4: DB con Lactato, incorporado a las 48 h. de almacenaje a 5°C. ns: Diferencias no significativas entre tratamientos en un mismo tiempo			

Cuadro 3. Motilidad en las muestras adicionadas con Cafeína.			
Tratamiento	Tiempo (h)		
	48	72	96
-----%-----			
T3	47ns	35*	10*
T5	49ns	25*	15*

‡T3: DB con Cafeína, incorporado al momento de la dilución. T5 DB con Lactato, incorporado a las 48 h de almacenaje a 5°C. Diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0,01). ns: Diferencia no significativas entre tratamientos.

Fuente: Wilde, O.R., et al 2004.

Valdebenito (2007) estudió el efecto de la cafeína en la motilidad y fertilidad espermática en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se encontró que la densidad espermática obtenida en el pool de semen fue de $12,7 \pm 1,6 \times 10^9$ espermatozoides por ml. El menor tiempo de motilidad se registró con la solución control ($80,8 \pm 12,5s$) y el mayor valor ($165,0 \pm 18,8s$) en el tratamiento de 10mM de cafeína, observándose un descenso del tiempo de motilidad con el tratamiento de 20mM (Fig. 5). Las diferencias fueron significativas entre el control y los tratamientos 2, 3 y 4. Se determinó además, diferencias significativas entre los tratamiento 1-3 y 2-3.

El espermatozoide de salmónidos se caracteriza por estar inmóvil en el fluido seminal y sólo al tomar contacto con el agua y el Ca^{++} (Calcio) que contiene, se activa su motilidad sólo por aproximadamente 30 seg., esto ha motivado el uso de soluciones activadoras que prolongan la motilidad espermática y además, mejoran su fertilidad protegiendo la célula de un choque osmótico y mejorando su capacidad de generación de energía. Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran la capacidad de la cafeína de prolongar la motilidad espermática en truchas, ya que los valores de actividad registrados son muy superiores a los informados por la literatura para salmónidos. Valdebenito (2007) señala que la motilidad del espermatozoide de salmónidos puede ser intensificada y prolongada agregando cafeína en el diluyente espermático (Fig. 6). Este efecto se debe a que la cafeína inhibe a la enzima fosfodiesterasa permitiendo la acumulación de nucleótidos cíclicos, especialmente del AMPc intracelular, provocando un aumento de la actividad flagelar.

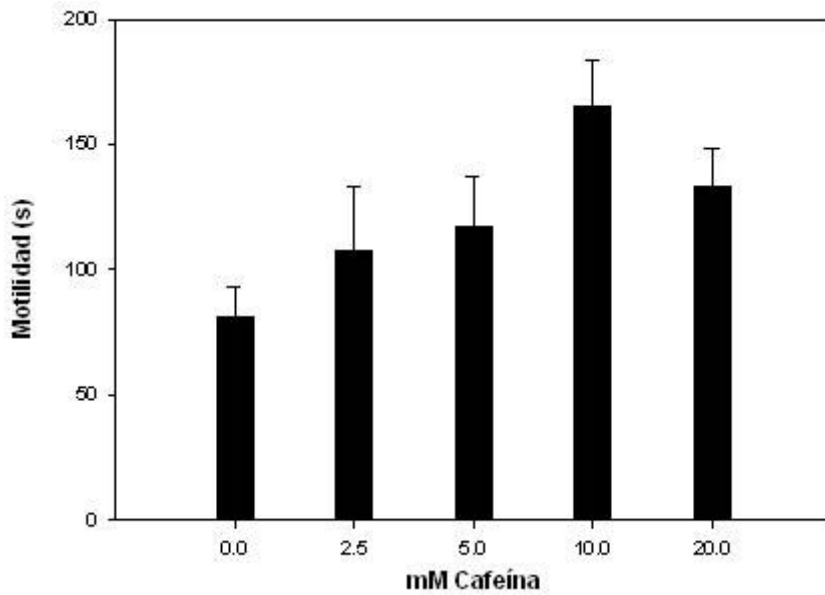


Fig. 5: Valores (promedios \pm Desviación estándar) de la motilidad (s) del espermatozoide de trucha arcoíris, obtenidos con diferentes concentraciones de cafeína.

Fuente: Valdebenito, N.I. 2007

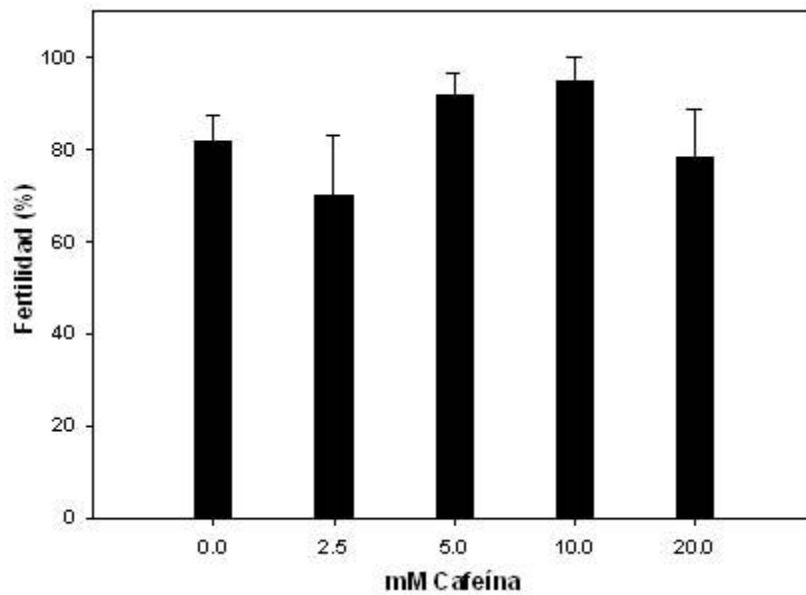


Fig. 6: Valores (promedios \pm Desviación estándar) de la fertilidad (%) del espermatozoide de trucha arcoíris, obtenidos con diferentes concentraciones de cafeína.

Fuente: Valdebenito, N.I. 2007

La adición de cafeína durante la fertilización, mejoró significativamente la duración de la motilidad, pero no la fertilidad del semen, criopreservado de trucha arcoiris activado con soluciones que contenían metilxantinas, usualmente incrementaron la motilidad y fertilidad, pero no significativamente con respecto a dosis de 5mM de teofilinas evitan la reducción de la motilidad espermática en esturiones hasta cinco minutos después de la activación (Valdebenito, 2007).

El incremento significativo de la motilidad espermática que produce la cafeína debiera reflejarse en un incremento de la fertilidad para justificar su incorporación en los activadores espermáticos de salmónidos, por lo que se deben realizar nuevas investigaciones que lo confirmen.

La cafeína a una concentración de 10mM en el medio isotónico de fertilización de ovas de trucha arcoiris, permite incrementar significativamente la motilidad espermática en trucha arcoiris (Fig.6).

Levis, (1990). Investigó la adición de cafeína al semen de cerdo y encontró que al envejecer los espermatozoides, los tratamientos con cafeína hicieron que aumentara su motilidad (Tabla 2).

Tabla 2. Motilidad de células con o sin adición de cafeína (diluyente BTS)

Edad del semen en días	Sin cafeína	Con cafeína	Diferencia
1 a 2	64%	78%	+ 14
3 a 4	53%	72%	+ 19
5 a 6	37%	62%	+ 25
7 a 8	23%	48%	+ 25

Fuente: Levis, D.G. 1990.

Boar Semen preservation II, Reproduction in Domestic Animals, Supl.1:369, 373, 1990.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El presente trabajo se realizó en la Granja Porcina “Las Palmas” localizada en el camino a Carrizalejo sin número en el Municipio de Zuazua N.L. También en la Granja Porcina y Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, los cuales se encuentran en el Km.17.5 de la carretera Estatal Zuazua-Marín, en Marín, N.L. El trabajo de campo se realizó en el período de un año, de abril del 2007 a abril del 2008.

3.2 Sementales

Se utilizaron tres cerdos, uno de la raza Hampshire (No.1) de 12 meses de edad proveniente de la Granja Porcina de la FAUANL y otros dos, el TIC 4 (No.2) y Tempo, Tepic (No.3) de la Granja “Las Palmas”, de 13 y 18 meses de edad, respectivamente.

Los sementales; se prepararon, revisando el manejo de los animales, su estado de salud y conformación, además fueron entrenados para realizar las montas en un potro de montas, el cual fue impregnado con orina de hembra en celo, se observó la libido de cada uno de los machos durante mas de 16 semanas.

La extracción del semen fue por el método de monta artificial y la técnica de la mano enguantada. Las muestras de semen se recolectaron en termos con bolsa de plástico y fueron llevadas al laboratorio para su evaluación y se mantuvieron a una temperatura de 37.5° C.

3.3 Aprendizaje y manejo de los sementales

El aprendizaje de los verracos se inició desde la entrada de los animales en cuarentena (primer semana). El contacto de los verracos con el maniquí fue supervisado por la persona habitualmente encargada de la granja y en el mismo corral donde se alojó el verraco, para no distraer su atención con un nuevo local. Para la monta de los verracos se utilizó un maniquí simple, muy bajo y cubierto con fuerte olor de esperma de verraco u orina de cerdas en celo. Se dejó que el verraco interactuara con el maniquí, bajo la estricta vigilancia del encargado. El verraco se colocó en el eje del maniquí, y se facilitó así la monta, volviéndose a realizar la operación varias veces, hasta que funcionó ya que esto no fue a la primera vez. Cada intento de monta duró de 15 a 30 min. Los verracos se acostumbraron a tener contacto con el maniquí y la mano del encargado de la granja. Para conservar el aprendizaje, se realizó una recolección cada semana o cada 15 días hasta el primer control microscópico o primer espermiograma.

3.4 Técnica de la mano enguantada

La colección del semen se hizo con la técnica de la mano enguantada, se agarró y estimuló manualmente el pene del cerdo, se utilizó guante estéril para dicho procedimiento, cuando se iniciaba la eyaculación, los primeros chorros, limpiaban la uretra y no se recolectaba.

Se dejó libre un espacio del pene al inicio para evitar, el escurrimiento del eyaculado sobre el guante. Se hizo presión fuerte y suficiente para la aprehensión del pene para que no se soltara, se dió estímulo manual al pene pero nunca se traccionó para no causar irritación al mismo, se recolectaron las 4 fases del eyaculado.

- a.) La primera secreción uretral: estas secreciones son los primeros chorros y no hay células espermáticas, solo sirve para limpiar el área prepucial.
- b.) Secreción con semen: de aspecto blanco lechoso, con 70% de las células espermáticas del total del volumen eyaculado.
- c.) Secreción pobre en semen: de aspecto claro acuoso, contiene menor cantidad de espermatozoos y puede ser observada alternando con la fase rica en semen.
- d.) Secreción gelatinosa: generalmente hacia el final de la eyaculación. El gel debe descartarse.

La recolección tuvo una duración por semental entre 10 y 20 minutos, siendo su término cuando el pene era retraído. Se descartó la porción superior desprendida con el filtro que contiene la secreción gelatinosa, después de recolectar el eyaculado se llevó inmediatamente al laboratorio para su evaluación y dilución. Durante la evaluación y hasta la dilución el eyaculado se mantuvo a una temperatura constante de 37.5° C.

Después del adiestramiento que duró 3 a 4 meses, a los sementales se les hizo una extracción de semen por semana, durante el transcurso de un año.

3.5 Técnicas de laboratorio

Primeramente se hizo la preparación del diluyente para el eyaculado, se disolvió la muestra del diluyente comercial para cerdo, Beltsville Thawing Solution (BTS) en agua bidestilada y posteriormente se mantuvo a 37.5° C.

Para la evaluación macroscópica del semen se tomó en cuenta: volumen, color y pH. Para evaluar microscópicamente se consideraron los siguientes parámetros: motilidad, morfología, y concentración espermática. Estas variables espermáticas solo fueron consideradas para evaluar la fertilidad del semental.

Se tomaron tres alícuotas de 50 ml cada una, con muestras de semen y diluyente BTS, las cuales quedaron de la siguiente manera, con cafeína (10 mM), adición de cafeína (10 mM) a las 48 horas y sin cafeína, fueron colocados en una

heladera a 17° C y evaluados en su motilidad con doble repetición, esta evaluación fue hecha en los siguientes tiempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h.

3.6 Diseño experimental

Se utilizó el programa SPSS versión 12.0 con un Diseño de arreglo factorial de 3 por 3 con dos repeticiones, donde la variable a medir fue la motilidad de las células espermáticas.

IV. RESULTADOS

El análisis de varianza para motilidad de las células espermáticas a las 12 h no mostró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 6 ver anexo). Sin embargo, a las 24 h se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos de cafeína y entre los sementales (Cuadro 9 ver anexo). La comparación de medias mostró que el tratamiento con cafeína tuvo una mayor motilidad comparado con el testigo. En cuanto a los sementales, el semental TIC 4 (No 2) fue superior al Hampshire (No.1) y no tuvo diferencias significativas con el Tempo, Tepic (No 3) ($P > 0.05$).

En los resultados a las 36 h se mantuvieron las tendencias obtenidas a las 24 h, el análisis de varianza mostró diferencias significativas para los tratamientos ($P = 0.001$) y los sementales ($P = 0.032$) (Cuadro 10 ver anexo). El tratamiento del semen con cafeína se mantuvo con mayor motilidad, comparado con el tratamiento sin cafeína (Cuadro 11 ver anexo). En cuanto a los sementales, también se mantuvo la misma tendencia, el semental (No.2) tuvo una mayor motilidad, aunque no fue diferente significativamente del semental (No.3) (Cuadro 12 ver anexo).

Los resultados obtenidos a las 48 h también mostraron diferencias significativas entre tratamientos y sementales (Cuadro 13 ver anexo). En el análisis de la comparación de medias de los tratamientos de cafeína ya se incluye el tratamiento aplicado a las 48 h, en este análisis se encontró que la aplicación de cafeína al inicio 0 h tuvo una mayor motilidad de semen comparado con la aplicación a las 48 h y el testigo (Cuadro 14 ver anexo). En cuanto a la comparación de medias de los sementales, se mantuvieron las mismas tendencias, la mayor motilidad se encontró en el semental (No.2) (Cuadro 15 ver anexo).

En el análisis de varianza de la motilidad del semen a las 60 h también se encontró diferencias significativas entre tratamientos de cafeína y sementales (Cuadro 16 ver anexo). En el Cuadro 17 se puede observar que los tratamientos de aplicación de cafeína a las 0 h y a las 48 h, no tuvieron diferencias significativas, sin embargo, hay una gran recuperación de la motilidad en el tratamiento de aplicación de cafeína a las 48 h (Cuadros 14 y 17 ver anexo). El tratamiento con la menor

motilidad fue el testigo. En cuanto a la motilidad del semen de los sementales, mantuvieron la misma tendencia, el semental (No. 2) tuvo la mayor motilidad.

Los resultados del estudio de la variabilidad del semen a las 72 h tuvieron las mismas tendencias de los análisis anteriores. El análisis de varianza mostró diferencias significativas para los tratamientos de cafeína y para los sementales (Cuadro 19 ver anexo). En cuanto a la diferencia entre los tratamientos de cafeína, sobresalió el tratamiento a las 48 h comparado con el tratamiento de cafeína a las 0 h, este resultado indica que una aplicación de cafeína incrementa considerablemente la motilidad en las horas siguientes a la aplicación y posteriormente el incremento se mantiene. El tratamiento con menor motilidad fue el testigo (Cuadro 20 ver anexo). Los sementales tuvieron el mismo comportamiento en cuanto a la motilidad del semen que en las horas anteriores. La mayor motilidad se observó en el semental (No. 2) (Cuadro 21 ver anexo).

El análisis de varianza para la motilidad del semen a las 84 h también mostró diferencias significativas entre los tratamientos y los sementales (Cuadro 22 ver anexo). El tratamiento de aplicación de cafeína a las 48 h. tuvo una mayor motilidad, seguido del tratamiento de aplicación de cafeína a las 0 h y finalmente, con la menor motilidad el testigo (Cuadro 23 ver anexo). En cuanto a la comparación de sementales, se mantienen las tendencias de los análisis anteriores, el semental (No 2) resultó con la mayor motilidad (Cuadro 24 ver anexo).

Los resultados de los análisis de motilidad a los 96 h tuvieron semejantes tendencias a los resultados anteriores. El análisis de varianza presentó diferencias significativas para los tratamientos y los sementales (Cuadro 25 ver anexo). En cuanto a la diferencia de los tratamientos de cafeína a las 0 h y las 48 h, no se encontró diferencia entre ellos, sin embargo, el testigo mostró una menor motilidad (Cuadro 26 ver anexo). La diferencia entre los sementales siguió con la misma tendencia, el semental (No. 2) obtuvo la mayor motilidad (Cuadro 27 ver anexo). Los resultados y sus tendencias se pueden observar en los cuadros 4 y 5 y en la figura 7 y 8.

Tratamiento	Tiempo de medición (h)						
	24	36	48	60	72	84	96
Con Cafeína	55.7 a	52.2 a	49.0 a	46.7 a	41.2 b	35.6 b	32.6 a
Adición de Cafeína las 48 h			43.8 b	50.4 a	47.4 a	43.8 a	39.2 a
Sin Cafeína	49.5 b	43.4 b	40.7 b	36.3 b	33.6 c	26.9 c	24.3 b
P	0.014	0.001	0.024	0.000	0.000	0.000	0.001

Cuadro 4: Comparación de medias en motilidad (%) de las células espermáticas del cerdo de acuerdo al tratamiento y hora de exposición a la cafeína.

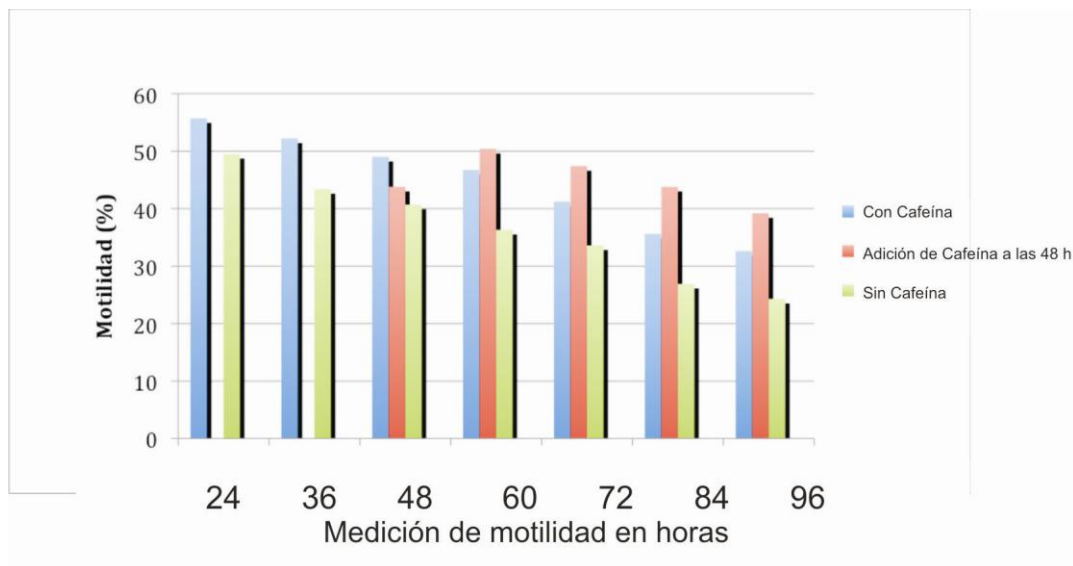


Figura 7. Comparación de medias de motilidad (%) de células espermáticas del cerdo, según tratamiento y a diferentes tiempos.

Tratamiento	Tiempo de medición (h)						
	24	36	48	60	72	84	96
Hampshire (Semental No. 1)	48.8 b	43.7 b	40.3 b	41.5 b	39.4 b	33.6 b	27.2 b
TIC 4 (Semental No. 2)	56.4 a	51.8 a	50.2 a	49.2 a	46.2 a	43.9 a	41.9 a
Tempo,Tepic (Semental No. 3)	52.6 ab	47.9 ab	43.1 b	42.7 b	36.6 b	28.7 b	27.0 b
P	0.033	0.032	0.004	0.010	0.005	0.000	0.000

Cuadro 5. Comparación de medias en motilidad (%) de las células espermáticas del cerdo de acuerdo al semental y hora de exposición a la cafeína.

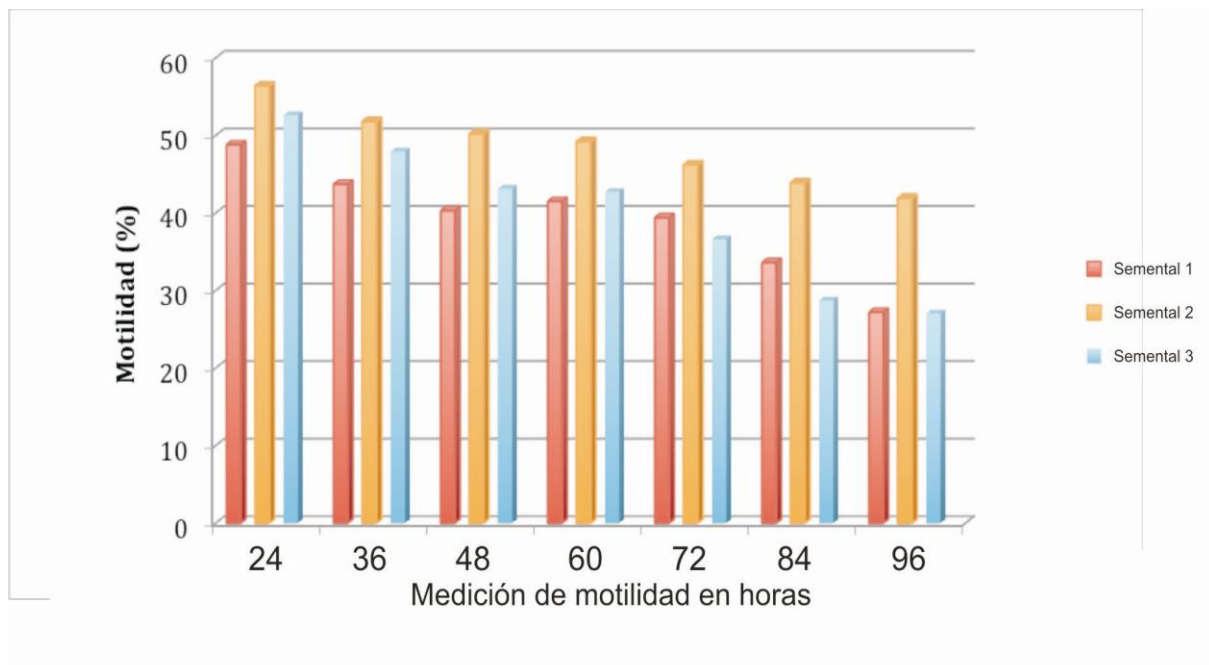


Figura 8. Comparación de sementales de acuerdo al tratamiento y hora de exposición a la cafeína.

Las tendencias de los resultados de la aplicación de cafeína se muestran en la Figura 9 y 10.

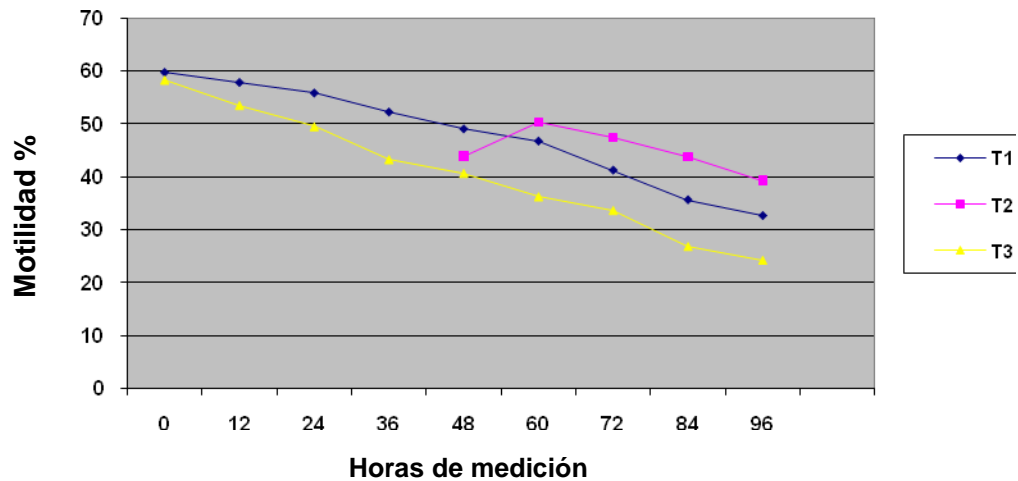


Figura 9. Motilidad (%) de los espermatozoides de acuerdo al tratamiento de cafeína (T1=Con cafeína desde las 0 h T2=Con cafeína aplicada a las 48 h y T3=Testigo) en función del tiempo.

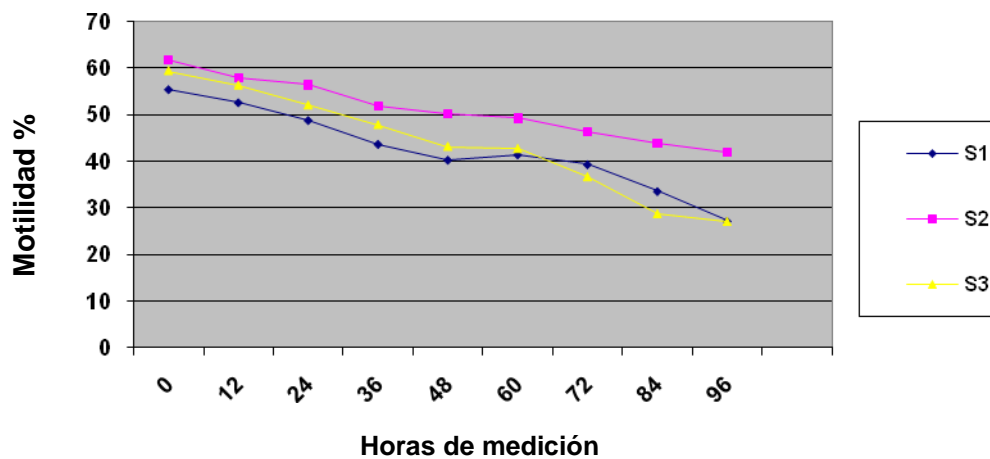


Figura 10. Motilidad espermática del semen de los tres sementales (S1, S2, S3) en función del tiempo.

V. DISCUSIÓN

La motilidad de los espermatozoides es evaluada debido a que está correlacionada con la fertilidad, cuando la motilidad es menor al 60%, el semen deberá rechazarse debido a que la fertilidad se ve afectada. Los tratamientos de aplicación de cafeína al semen incrementaron notoriamente la motilidad del mismo; este resultado se observó en el tratamiento a las 0 h y a las 48 h. Además, se observó que el efecto de la cafeína sobre la motilidad del semen permanece hasta los 96 h que duró el estudio. Este resultado coincide con lo reportado por Reed y Curnock (1990), quienes evaluaron tres diluyentes para la conservación de semen de cerdo con y sin adición de cafeína; los resultados mostraron un incremento significativo en motilidad del semen en los tres diluyentes con la adición de cafeína, permaneciendo las diferencias en motilidad en todos los períodos estudiados, como ocurrió en el presente estudio.

Este efecto se debe a que la cafeína inhibe a la enzima fosfodiesterasa permitiendo la acumulación de nucleótidos cíclicos, especialmente del AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) intracelular, provocando un aumento de la actividad flagelar (Aitken et al., 1983; Morisawa, 1994).

En cuanto a la diferencia en motilidad espermática de los sementales, se encontró que el semental No. 2, tuvo una mayor motilidad del semen en todos los períodos de tiempo analizados (figura 8), indicando que existe variabilidad entre los sementales. Este resultado es similar al reportado por Roca *et al* (2006), quienes estudiaron diferentes factores que influyen en la supervivencia del semen después de congelado y descongelado; el estudio reportó que el factor que más influyó en la supervivencia fue el de semental. En observaciones con adición de cafeína como reconstituyente otros autores (Wilde *et al.*, 1989; 1990) encontraron que al agregar cafeína al reconstituyente del semen congelado en bovinos, no funcionó. Haciendo comparación con este trabajo de investigación en donde al semen de cerdo, se le agregaron 10mM de cafeína al diluyente, en refrigeración a 17° C., con observaciones a diferentes tiempos, se coincidió con la utilización de 10 Mm. Al igual que en trabajos con semen de pavos (Parkhurst, *et al.*, 2000). Encontrando que

la cantidad utilizada de cafeína es la apropiada y coincide con Breininger *et al* 2003 donde sugieren la utilización de pequeñas cantidades de cafeína para que funcione como agente capacitante.

En cuanto a la temperatura adecuada para la preservación de semen de cerdo a 17 °C, se tomaron en cuenta las características del mismo a la resistencia al congelado, no coincidiendo con la utilizada para las demás especies. Tal es el caso de Wilde, *et al* (2004), quienes probaron el efecto de la adición de la cafeína y lactato sobre la motilidad del semen equino diluido en leche descremada –glucosa. En la utilización de cafeína y lactato de sodio agregados al momento de la dilución, posterior a las 48 h y mantenido a 5°C. y posterior a las 48 h y posterior cultivo a 37°C. encontrándose diferencia significativa entre tratamientos con adición de cafeína.

Se encontró concordancia de este trabajo de investigación, con trabajos realizados (Tabla 2.) con Levis (1990). En cuanto a la adición de 10 mM, a las 48 h obteniéndose diferencias significativas en cuanto los demás tratamientos, sin adición de cafeína y con cafeína al inicio de la dilución.

VI. CONCLUSIONES

Se encontró diferencia significativa en la motilidad del semen entre los tratamientos de cafeína y entre los sementales, también se observó diferente motilidad a través del tiempo (12 a 96 h).

Los resultados mostraron que no hubo interacción entre sementales y tratamientos, por lo que las diferencias entre los tratamientos de cafeína son independientes de la motilidad del semen presentada en cada semental; es decir que la motilidad del semen se incrementa con la adición de cafeína en sementales con alta o baja motilidad del semen. La cafeína es un estimulador y capacitador de las células espermáticas.

VII. RECOMENDACIONES

Por lo tanto se asume que:

1. La cafeína adicionada en cantidades adecuadas (10 mM) al diluyente, tratándose de la especie porcina es tolerada perfectamente por las células espermáticas.
2. La duración de vida de las células con adición de cafeína, puede ser utilizada para la realización de inseminaciones artificiales en hembras porcinas dada su característica poliestral. Adicionando la cafeína, después de las 48 h.
3. Los efectos de la cafeína son variados en la especie porcina.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R.J., F. Best, D.W.** 1983. Richardson, R. Schats y G. Simm, Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*. 67:19-27.
- Bearden, H. J. y J. W. Fuquay.** 1982. Reproducción animal aplicada. Editorial El Manual Moderno .S.A. de C. V. 1982. p. 131 y 141.
- Bonet, S and M. D. Briz.** 1991. New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Theriogenology* 35:725-731.
- Breininger ,E.,C. M. O'Flaherty, N.B. Berorlegui y M.T. Beconi.** 2003. Inductores de la capacitación y viabilidad espermática en semen porcino crío conservado. 26 Congreso Argentino de Producción Animal. Asociación Argentina de Producción Animal. Mendoza, Argentina
- Colenbrander B. and B. Kemp.** 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 40: 105-115.
- Colenbrander, B., H. Feitsma and H.J. Grooten.** 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J Reprod Fert Suppl.* 48: 207-215.
- Córdova I, A. R. Muñoz M., M.S. Córdova J., C. Córdova J. y J. F. Pérez G.** 2004. Características del semen del verraco y su evaluación práctica.
- Derivaux, J.** 1976. Reproducción de animales domésticos. Editorial Acribia. Zaragoza (España). pp: 197-199.
- Erazo F., E.** 2007 Efecto de la crioconservación sobre las características microscópicas del espermatozoide porcino. Tesis de Licenciatura. Zamorano Honduras.
- Fraser, L., K. Gorszczaruk and J. Strzezek.** 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 325-329.

- Gadea, J, F. García V. and C. Matás.** 2004. Changes in membrane sulfhydryl status of boar spermatozoa by freezing. *Reprod Fertil Dev.* 16. 265-266.
- Gadea, J.** 2004. El uso de semen porcino congelado. *Mundo ganadero.* 169: 60-62.
- Gadea, J., C. Matás and X. Lucas.** 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 95-108.
- Gadea, J., S. Ruiz S, P. Coy, A. Poto, B. Peinado, R. Romar, I. Campos y O, Zubillaga.** 1998. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. *Arch. Zootec.* 47: 299-304.
- García A., C., J.C. Fontanillas, J. Pérez, I. García, S. Marín y T. Pérez.** 1994. Técnicas de tinción espermática. *Porci-Aula Veterinaria.* 21: 11-18.
- Gilmore, J.A., J. Du, J. Tao, A.T. Peter and J.K. Crister.** 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.:* 107, 87-95.
- Harrison, R.A.P., H.M. Dott, and G.C. Foster.** 1978. Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J. Reprod. Fert.* 52: 65-73
- Herrera B., José A.** 2000. Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos con problemas reproductivos. Tesis. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. p. 9.
- Holt, W.** 1982. Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *J. Reprod. Fertil.* 64: 485-489.
- Holt, W.** 1996. Can we predict fertility rate? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31(1): 17-24.
- Levis, D. G.** 1990. Boar semen preservation II. *Reproduction in domestic animals,* Supl.1:369, 373.
- Martín R., S.** 1982. Reproducción e inseminación artificial porcina: Características del esperma. Editorial Aedos. Barcelona. pp: 75-83.
- Martín R., S.** 1996. Semen de verraco: Evaluación práctica. *Archivos de reproducción animal.* 1: 12-23.
- McDonald, L.E.** 1981. Reproducción y endocrinología veterinarias. Segunda edición .Nueva Editorial Interamericana. p. 222- 223 y 225
- Morisawa, M.** 1994. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoological Science* 11:647-662.

- Newth, M. S. and D. G. Levis.** 1999. Change in pH boar semen extenders. Nebraska Swine Report. 3-6.
- Palma, G. A.** 2001. Biotecnología de la reproducción. Primera Edición. Reprobiootec.
- Parkhurst, A. M., N. Korn y R. J. Thurston.** 2000. Efectos de metilxantinas en la movilidad de los espermias almacenados de pavos . Department of Animal and Veterinary Sciences, Clemson University. Clemson, Carolina del Sur. Poultry Science. 78:1803-1809
- Paulenz, H., E. Kommisrud, and P.O. Hofmo.** 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. Reprod. Dom. Anim. 35:83-87.
- Pursel, V. G., L.A. Johnson and L. L. , Schulman.** 1973. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 37: 528-531.
- Quintero M., A.** 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Reed, H. C. B., and R. M. Curnock.** 1990. Comparison of three liquid semen diluents in a national semen delivery service in Great Britain. Proc. 2nd International Conference on Boar Semen Preservation, Beltsville, Maryland. Editors: L. A. Johnson and D. Rath. Reproduction in Domestic Animals (Supplement 1), pp 369-373.
- Reid, T. R.** 2008. Cafeína. Revista National Geographic en Español. pp:3-34.
- Rigau, T., J. Piedrafita, J. Reverter., M. Canal, and J.E. Rodriguez G.** 1996. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. Anim. Reprod. Sci.: 43, 161-172.
- Roca, J., Hernández, M. Carvajal, J.M. Vázquez, and E.A. Martínez.** 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. University of Murcia E-30071 Murcia, Spain. J. Anim. Sci. 2006. 84:2692-2699.
- Sorensen, A.M.** 1979. Animal Reproduction, Principles and Practices. Mc Graw-Hill p. 100
- Valdebenito, N.I.** 2007. Efecto de la cafeína en la motilidad y fertilidad espermática de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) Universidad Católica de Temuco,-Chile. Información Tecnológica Vol.18(2): 61-65.

- Waberski, D., S. Meding., and G. Dirksen.** 1994a. Fertility of long-term stored boar semen: Influence of extenders (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 145-151.
- White, I.G.** 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.
- Wilde, O.R., De La Vega A.C. y Parra, R.W.** 1989-1990. Respuesta del semen descongelado en diluyentes cafeinados, *Rvta. Agron. N.O. Argent.* XXV (1-4) 65-83.
- Wilde, O.R., De La Vega A.C. Y Cruz M.L.** 1996-1997. Falla de la cafeína en realzar la motilidad (hiperactividad) en semen congelado. *Rvta. Agron. N.O. Argent.* XXVIII (1-4): 85-95.
- Wilde, O.R. , A. C. de la Vega y M.L. Cruz.** 2004. Efecto de la adición de cafeína sobre la motilidad del semen equino diluido en leche descremada-glucosa.
- Wilmore, J.H. y Costill, D.L..** 2007. *Fisiología del Esfuerzo y del Deporte*, pp 422 y 423.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS

Wikipedia. Cafeína.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Cafe%C3%ADna>.

<http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar021>

<http://www.agroinformacion.com/leer-contenidos.aspx?articulo=1054>.

Le Coz, P. 2006. Curso de inseminación artificial. Variaciones del semen y anomalías.

http://www.3tres3.com/inseminacion_artificial/index.php?id_ficha=27&id_rel=22.

Le Coz, P. 2006. Curso de inseminación artificial. Introducción.

http://www.3tres3.com/inseminacion_artificial/index.php?id_ficha=.

Le Coz, P. 2006. Curso de inseminación artificial. Diluyentes.

http://www.3tres3.com/inseminacion_artificial/index.php?id_ficha=37.

ANEXOS

Cuadro 6. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 12 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	160.794	1	160.794	2.983	.094
Semental (S)	192.465	2	96.232	1.786	.185
T * S	51.960	2	25.980	.482	.622
Error	1616.887	30	53.896		
Total	2051.595	35			

Cuadro 7. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 24 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	336.093	1	336.093	6.819	.014
Semental (S)	379.390	2	189.695	3.849	.033
T * S	60.869	2	30.435	.617	.546
Error	1478.686	30	49.290		
Total	2300.070	35			

Cuadro 8. Comparación de medias de la motilidad de Los espermatozoides después de 24 h de tratamiento con cafeína.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con cafeína	55.708 a	1.670	52.297	59.120
Sin Cafeína	49.539 b	1.670	46.128	52.951

Cuadro 9. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 24 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No.1	48.807 b	1.876	44.975	52.639
No. 2	56.465 a	2.027	52.326	60.604
No. 3	52.600 ab	2.220	48.066	57.134

Cuadro 10. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 36 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	701.914	1	701.914	12.696	.001
Semental (S)	429.103	2	214.551	3.881	.032
T * S	77.688	2	38.844	.703	.503
Error	1658.558	30	55.285		
Total	2944.012	35			

Cuadro 11. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 36 h.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con Caf.	52.284 a	1.769	48.670	55.897
Sin Caf.	43.369 b	1.769	39.755	46.982

Cuadro 12. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 36 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No.1	43.728 b	1.987	39.669	47.786
No. 2	51.866 a	2.146	47.482	56.250
No. 3	47.884 ab	2.351	43.082	52.686

Cuadro 13. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 48 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	621.762	2	310.881	4.062	.024
Semental (S)	974.276	2	487.138	6.365	.004
T * S	136.338	4	34.085	.445	.775
Error	3444.045	45	76.534		
Total	5263.954	53			

Cuadro 14. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 48 h.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con Caf.	49.038 a	2.082	44.846	53.231
Ad.Caf.	43.898 b	2.082	39.705	48.090
Sin Caf.	40.725 b	2.082	36.533	44.918

Cuadro 15. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 48 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No. 1	40.324 b	1.909	36.479	44.169
No. 2	50.184 a	2.062	46.030	54.337
No. 3	43.154 b	2.259	38.604	47.703

Cuadro 16. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 60 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	1899.875	2	949.938	15.097	.000
Semental (S)	648.051	2	324.026	5.150	.010
T * S	119.106	4	29.776	.473	.755
Error	2831.525	45	62.923		
Total	5548.104	53			

Cuadro 17. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 60 h.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con Caf.	46.716 a	1.887	42.914	50.517
Ad. Caf.	50.417 a	1.887	46.616	54.219
Sin Caf.	36.276 b	1.887	32.474	40.077

Cuadro 18. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 60 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No. 1	41.465 b	1.731	37.978	44.951
No. 2	49.250 a	1.870	45.484	53.016
No. 3	42.694 b	2.048	38.569	46.819

Cuadro 19. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 72 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	1672.456	2	836.228	11.787	.000
Semental (S)	836.169	2	418.084	5.893	.005
T * S	74.442	4	18.611	.262	.901
Error	3192.505	45	70.945		
Total	5855.986	53			

Cuadro 20. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 72 h.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con Caf.	41.179 b	2.004	37.143	45.216
Ad. Caf.	47.407 a	2.004	43.371	51.444
Sin Caf.	33.666 c	2.004	29.630	37.703

Cuadro 21. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 72 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No. 1	39.363 b	1.838	35.662	43.065
No. 2	46.247 a	1.985	42.249	50.246
No. 3	36.642 b	2.175	32.262	41.022

Cuadro 22. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 84 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	2514.487	2	1257.243	12.164	.000
Semental (S)	2051.343	2	1025.672	9.923	.000
T * S	194.525	4	48.631	.471	.757
Error	4651.169	45	103.359		
Total	9485.537	53			

Cuadro 23. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 84 h.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con Caf.	35.569 b	2.419	30.697	40.441
Ad.Caf.	43.797 a	2.419	38.925	48.669
Sin.Caf	26.925 c	2.419	22.053	31.797

Cuadro 24. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 84 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No. 1	33.610 b	2.219	29.141	38.078
No. 2	43.962 a	2.396	39.135	48.788
No. 3	28.719 b	2.625	23.432	34.006

Cuadro 25. Análisis de varianza para la motilidad del semen a las 96 h.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Tratamientos (T)	1973.826	2	986.913	8.036	.001
Semental (S)	2630.755	2	1315.378	10.710	.000
T * S	324.493	4	81.123	.661	.623
Error	5526.541	45	122.812		
Total	10587.312	53			

Cuadro 26. Comparación de medias de tratamientos de cafeína en la motilidad del semen a las 96 h.

Trata	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
Con Caf.	32.626 a	2.637	27.315	37.936
Ad. Caf.	39.269 a	2.637	33.959	44.580
Sin Caf.	24.349 b	2.637	19.039	29.660

Cuadro 27. Comparación de medias de sementales en la motilidad del semen a las 96 h.

Semental	Media	Error Est.	Intervalo de Confianza 95%	
			L. I.	L. S.
No. 1	27.235 b	2.418	22.364	32.106
No. 2	41.962 a	2.612	36.701	47.223
No. 3	27.047 b	2.861	21.284	32.810