

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“CONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN  
REFRIGERACIÓN, USANDO EL DILUTOR CON AGUA  
DE COCO (*Cocus nucifera* L.), EN TINGO MARÍA”**

**TESIS**

**Para optar al título de**

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**ALEJANDRO ENRIQUE JULCA SALVADOR**

**TINGO MARÍA – PERÚ**

**2014**



**T**

**ZOO**

**Julca Salvador, Alejandro Enrique**

Conservación de semen porcino en refrigeración usando el dilutor con agua de Coco (*Cocus nucifera* L.), en Tingo María. Tingo María 2014

50 páginas.; 6 cuadros; 2 figuras.; 43 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Zootecnista) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú) Facultad de Zootecnia

**1- CONSERVACION 2- SEMEN 3- REFRIGERACION**

**4- DILUTOR 5- AGUA DE COCO 6- COCUS NUCIFERA**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA  
Av. Universitaria Km. 2 Teléfono: (062) 561280  
TINGO MARÍA

-----  
"Año de la Promoción de la Industria y del Compromiso Climático"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 30 de diciembre de 2013, a horas 10:00 am. para calificar la tesis titulada:

**"CONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO EN REFRIGERACIÓN, USANDO EL DILUTOR CON AGUA DE COCO (*Cocus nucifera* L) EN TINGO MARIA".**

Presentada por el Bachiller **ALEJANDRO ENRIQUE JULCA SALVADOR**; después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobada con el calificativo de **"MUY BUENO"**.

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el **TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título, de conformidad con lo establecido en el Artículo 95, inciso "i" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 17 de junio de 2014

-----  
MSc. TEODOLFO VALENCIA CHAMBA  
Presidente



-----  
Ing. NILA RIVERA Y IBARCENA  
Miembro

(Ausente)

-----  
Dr. MILTHON MUÑOZ BERROCAL  
Miembro

-----  
MSc. JORGE JUAREZ MORENO  
Miembro - Asesor

## DEDICATORIA

A Dios, por su gran misericordia, por darme fuerza y sabiduría para enfrentar obstáculos y seguir adelante aún en los momentos más difíciles. A Jesús, en eterna gratitud y amor, por haber dado su vida por la mía.

A mis queridos padres: Alejandro Julca León y Angélica Salvador Rojas, quienes me dieron la vida y me enseñaron a vivirla, por su incondicional apoyo y por su valioso empeño por lograr que su hijo logre sus metas.

A mis hermanos: Angélica, Francisco y Ana Paola por su confianza y sobre todo incentivar me a salir adelante.

## **AGRADECIMIENTO**

- A mi Alma Mater, Universidad Nacional Agraria de la Selva, por su contribución en mi formación profesional.**
  
- A los docentes de la Facultad de Zootecnia quienes me han formado con sus enseñanzas, teóricas y prácticas a lo largo de mi carrera universitaria.**
  
- Al Ing. M.Sc. Jorge Juárez Moreno, asesor de la presente tesis por darme su amistad y asesoramiento en el desarrollo científico y académico del presente trabajo de investigación.**
  
- A los miembros del jurado de tesis, Ing. Nila Rivera y Ibarcena, Med. Vet. M.Sc. Teodolfo Valencia Chamba y Dr. Milthom Muñoz Berrocal por el aporte académico y científico.**
  
- A mis amigos, que de una u otra manera colaboraron y me apoyaron en la realización del presente trabajo de investigación.**

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Inseminación artificial.....	4
2.2. Composición del semen de verraco .....	6
2.2.1. Espermatozoides.....	6
2.2.2. Plasma seminal .....	6
2.3. Fracciones del eyaculado.....	7
2.4. Glucólisis del espermatozoide.....	8
2.5. Evaluación general del semen .....	9
2.6. Conservación del semen.....	10
2.7. Diluyentes .....	11
2.7.1. Funciones del diluyente .....	12
2.8. Diluyentes para refrigeración .....	14
2.8.1. Leche de vaca .....	14
2.8.2. Yema de huevo.....	15
2.8.3. Agua de coco.....	15
2.8.4. BTS (solución de descongelamiento Betsville).....	17
2.9. Agua de coco .....	17
2.9.1. Composición del agua de coco.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo.....	20

3.2. Tipo de investigación.....	20
3.3. Animales en estudio.....	21
3.4. Colección del semen .....	21
3.5. Análisis y evaluación de la calidad seminal.....	22
3.5.1. Examen macroscópico .....	22
3.5.2. Examen microscópico.....	24
3.6. Dilución y conservación del semen .....	28
3.7. Variables independientes .....	30
3.8. Tratamientos en estudio.....	30
3.9. Croquis de distribución del tratamiento .....	31
3.10. Análisis estadístico.....	31
3.11. Variables dependientes.....	32
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. Evaluación seminal previa a la dilución del conjunto de semen ..	34
4.2. Evaluación de la calidad seminal post dilución y almacenado ....	34
4.2.1. Evaluación morfológica post dilución.....	34
4.2.2. Porcentaje de motilidad progresiva individual de los espermatozoides a las 0 horas y 24 horas post dilución. .	36
4.2.3. Efecto de los dilutores empleados sobre la viabilidad de los espermatozoides, a las cero y 24 horas de evaluación. ....	38
4.3. Costos del uso de los dilutores utilizados con coco .....	39
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
5.1. Evaluación seminal antes de la dilución.....	41

5.2. Efecto de los dilutores sobre la motilidad progresiva individual ..	42
5.3. Efecto de las diluciones sobre la viabilidad de los espermatozoides a las 0 y 24 horas.....	44
5.4. Costo de los dilutores.....	46
VI. CONCLUSIÓN.....	47
VII. RECOMENDACIONES .....	48
VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	50

## ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro	Pág.
1. Croquis de distribución del tratamiento.....	31
2. Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de verracos utilizados en el experimento pos mezcla y dilución .....	35
3. Evaluación de las características morfológicas del semen de verracos en el experimento post mezcla y dilución.....	35
4. Efecto de los dilutores empleados sobre la motilidad progresiva individual, a las cero y 24 horas.....	37
5. Efecto de las diluciones sobre la viabilidad a las 0 y 24 horas .....	38
6. Costo de los productos por tratamientos elaborados como dilutores ..	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Efecto de los dilutores empleados sobre la motilidad progresiva individual, a las cero y 24 horas post dilución del semen. ....	37
2. Efecto de los dilutores empleados sobre la viabilidad (%), a las cero y 24 horas post dilución del semen.....	39

## RESUMEN

La implementación de la inseminación artificial (IA) en la selva peruana en pequeñas crías porcinas todavía enfrenta ciertos problemas, como la disponibilidad de semen de buenos reproductores, el empleo de dilutores comerciales y la falta de técnicos inseminadores. Con el objetivo de evaluar la respuesta de la conservación de semen porcino en refrigeración (16°C), usando como dilutor el agua de coco (*Cocus nucifera* L.), se implementó el presente estudio, en la Universidad Nacional Agraria de la Selva ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco – Perú. Se empleó la mezcla de los eyaculados de tres verracos de diferentes razas, con edades entre 3 a 5 años y con fertilidad comprobada, el semen fue mezclado con BTS (Betsville Thawing Solutions), solución agua de coco (SAC) o dilutor agua de coco (DAC) en diferentes proporciones. Se utilizó un diseño completamente al azar, con siete tratamientos y tres repeticiones, para la contrastación estadística entre medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), en variables paramétricas y la prueba de Kruskal Wallis en variables no paramétricas, procesando los datos con programa INFOSTAT (versión libre). Los resultados muestran que T2 (DAC), tiene un valor aceptable tanto para la motilidad (63.33%) y viabilidad (55%) para la conservación de semen porcino a 16°C hasta por 24 horas, así mismo, se determinó que el T3 (DAC 60% + BTS 40%) obtuvo similar motilidad (66%) y de viabilidad (61.67%) al obtenido por el dilutor comercial (BTS). Así mismo los costos de usar el DAC (T1 = agua de coco puro) para la conservación de semen porcino, en refrigeración a 16°C, resulta más económico (S/. 8.50) que los demás dilutores evaluados. Concluyendo que es factible el uso del agua de coco como dilutor de semen porcino hasta por 24 horas de refrigeración a 16°C.

**Palabras Claves:** Conservación, semen, refrigeración, dilutor, agua de coco, *Cocus nucifera* L, motilidad, viabilidad.

## I. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) en la actualidad forma parte integral de la rutina de trabajo reproductivo en todo tipo de explotación porcina, habiendo sido masificado su uso en estas últimas décadas, llegando a servirse casi a la totalidad de las marranas a nivel mundial bajo esta biotecnología, sobre todo en las granjas de producción porcina intensiva.

El desarrollo de la IA en porcinos ha conllevado a la implementación de otras biotecnologías muy relacionadas, como la conservación del eyaculado, la sincronización de celos y el manejo de verracos, que desde luego han permitido maximizar el uso de los sementales de alto valor genético. El poco éxito del uso de semen congelado porcino, debido en gran parte a la fragilidad de estos a la criopreservación, han posibilitado el empleo de semen refrigerado diluido para la IA, el cual ha demostrado ser eficiente en obtener altas tasas de fertilización con buenos tamaños de camada.

En la actualidad es común el uso de dilutores comerciales, que preservan el semen desde uno hasta diez días a temperaturas que oscilan entre los 15°C y 19°C, que le agregan un costo adicional al semen, pero

preservando en gran medida la calidad seminal del semen obtenido por un corto periodo de tiempo (días).

Sin embargo, la implementación de la IA en la selva peruana en pequeñas crianzas porcinas todavía enfrenta ciertos problemas, como la disponibilidad de semen de buenos reproductores, el empleo de dilutores comerciales y la falta de técnicos inseminadores.

El agua de coco (*Cocus nucifera* L.) se ha venido empleando como dilutor de semen en varias especies domésticas y silvestres, pero en nuestra zona no existen reportes científicos del uso de este como dilutor en semen porcino, por lo que con esta investigación se requirió averiguar ¿Cuál será la eficiencia del agua de coco como parte del dilutor de semen porcino en la conservación de la calidad espermática, bajo refrigeración (16°C), en Tingo María? Por tal motivo nos planteamos la siguiente hipótesis.

El agua de coco por sus características químicas, alto contenido de glucosa y su bajo costo, es eficiente para la conservación de la calidad espermática del semen porcino a temperatura de refrigeración.

**Objetivo General:**

Evaluar la calidad espermática del semen porcino, conservado en refrigeración (16°C), extendido en agua de coco (*Cocus nucifera* L.), en Tingo María.

**Objetivos específicos:**

- Determinar la dilución del agua de coco (*Cocus nucifera* L.), que dé mejor calidad espermática en el semen porcino, conservado en refrigeración (16°C), en Tingo María.
  
- Estimar la motilidad progresiva individual y viabilidad del semen porcino, diluido con agua de coco (*Cocus nucifera* L.), conservado en refrigeración (16°C), en Tingo María.
  
- Calcular los costos del semen porcino, conservado con el dilutor de agua de coco (*Cocus nucifera* L.), en refrigeración (16°C), en Tingo María.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Inseminación artificial.

La inseminación artificial en cerdos no es una técnica nueva, se tienen informes tan antiguos de la colecta de semen para inseminación como de la década de 1930, el uso de la inseminación artificial ha aumentado en los Estados Unidos, el cual ha sido el mejor investigador de esta área durante los últimos años. Esta técnica ha tomado auge en las explotaciones porcinas en diferentes países, debido a la tendencia a la tecnificación, el aumento del número de cerdas en gestación y las necesidades del mercado de carne y de animales de reemplazo (PRERA, 2002).

Las primeras inseminaciones en porcinos se realizaron en la Unión Soviética, a partir de las experiencias llevadas a cabo por Ivanow en 1931, más tarde Lipatov, Rodin y Camisarov, realizaron una serie de trabajos que llevaron a la introducción del maniquí para la colecta de semen, descubriéndose posteriormente la vagina artificial. Esta última fue establecida como método de colecta de semen por (BONADONNA, 1938); Una vez resuelto el problema de la colecta de semen, quedaba por dilucidar las técnicas de dilución y conservación del mismo, desarrollándose a partir de 1950 (MAQUEDA, 2006).

La inseminación artificial porcina fue iniciada por Ivanov 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 Inseminación artificial porcina se produce a partir de la década de los 80, cuando se estandarizan los protocolos de inseminación (BECERRIL, 2004).

En la actualidad, la inseminación artificial 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 (GADEA, 2007).

Dentro de los factores que intervienen en el proceso de inseminación artificial porcina están los diluyentes de inseminación artificial. Desde su invención, las funciones de los diluyentes han sido, aumentar el volumen de eyaculado y preservar la viabilidad de los espermatozoides, el plasma seminal por sí solo no permite que haya una conservación duradera del semen (LANDSVERK, 2000).

La inseminación artificial es un proceso complejo, el semen debe evaluarse cuidadosamente, utilizando los mejores diluyentes, su manejo es decisivo, desde su despacho hasta la inseminación y al mismo tiempo deben asegurarse condiciones adecuadas de almacenamiento (VETEFARM, 2011).

## 2.2. Composición del semen de verraco

### 2.2.1. Espermatozoides

Los espermatozoides son únicos entre las células en su forma y función, maduros tienen una cabeza forma aplanada, portadora del núcleo y una cola, que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. El acrosoma o casquete acrosómico es una estructura de doble pared, situada en la porción anterior del núcleo. El cuello une a la cabeza del espermatozoide con su cola, la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal; Son células germinales, producto final de procesos de desarrollo complejos y no pueden experimentar posteriores divisiones o diferenciaciones (HAFEZ, 2000).

### 2.2.2. Plasma seminal

El plasma seminal permite a los espermatozoides, su transporte desde el sistema reproductor del macho, durante la eyaculación, hasta el tracto genital de la hembra. Es un fluido isoosmótico compuesto en un 75% por agua, llevando en disolución fructosa, ácido cítrico, sorbitol, inositol, fosfolípidos, prostaglandinas, enzimas y proteínas, además de iones inorgánicos como sodio, potasio y cloro (NISHIKAWA, 1964).

Presenta un pH neutro sostenido por un complejo sistema tampón que protege a los espermatozoides de los cambios de pH, que afectan la supervivencia de las células espermáticas, cuya función química es mantener

la bioquímica nutricional del espermatozoide donde 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 por lo que su alimentación del espermatozoide se ve afectada. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como índice de calidad seminal. (MAXWELL y EVANS, 1990).

### 2.3. Fracciones del eyaculado

En trabajos realizados por LAURENTIN Y LORDAN, (2004) y ENOS (1960), encontraron tres tipos de fracciones presentes en el eyaculado de los verracos:

**Fracción 1, Fracción pre espermática**, la cual es acuosa y de fácil identificación por su transparencia y su función es limpiar el paso del semen por el pene, limpiando así las vías genitourinarias; Es la primera 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.

Fracción 2, Fracción rica en espermatozoides, que comprenden líquidos que son espesos, blanquecinos y opacos, ya que contienen la mayor carga espermática y es la de mayor importancia del eyaculado, esta es la fracción que se colecta con fines de inseminación

Fracción 3, Gel o tapioca, que procede de las glándulas de Cowper y que consta de unos grumos gelificados que se expulsan al final del eyaculado después de la fracción rica en espermatozoides, esta es desechada porque aumenta las aglutinaciones espermáticas en el semen colectado. 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.

#### 2.4. Glucólisis del espermatozoide

En condiciones anaeróbicas, los espermatozoides degradan glucosa, fructuosa o manosa a ácido láctico. Esta actividad glucolítica o más correctamente fructolítica, porque la fructuosa es el principal azúcar del semen, permite a esos gametos sobrevivir en las condiciones anaeróbicas, ésta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoide para su uso en inseminación artificial (HAFEZ, 2000).

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, el que suministra los nutrientes (glucosa, sacarosa), necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático para su traslado a través del genital femenino, en el eyaculado, esta actividad metabólica sólo puede mantenerse durante un período de tiempo muy limitado, ya que los cambios de pH pueden alterar el metabolismo, para poder conservar los espermatozoides durante períodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura (FUENTES *et al.*,2005).

## 2.5. Evaluación general del semen

Para el control efectivo del semen a ser utilizado inmediatamente después de la colecta en un vaso de precipitación libre de impurezas y protegido de la luz, es necesario que sea analizado en cuanto a los aspectos físicos macroscópicos (volumen, coloración, presencia de aglutinación, olor, densidad) y microscópicos (concentración, motilidad, mortalidad), conforme descrito en sus trabajos por HAFEZ (2000).

La evaluación general del semen consta de dos evaluaciones que son macroscópicos y microscópicos. En las siguientes observaciones se pueden apreciar los análisis que consta cada evaluación que se practica en nuestro medio: Temperatura: 37°C, volumen: 200 ml, consistencia: lechosa, olor: sui generis, color: blanquecino, pH: 7.5, impurezas: ninguna,

espermatozoides vivos y muertos: 90 % , motilidad: 85 % , aglutinación ++, concentración espermática:  $0.33 \times 10^9$  esperm./mm<sup>3</sup> , anomalías: 15 % parámetros que se deben cumplir para que un concentrado de espermatozoides puedan diluirse y ser fértiles (LORDAN ,2004).

## 2.6. Conservación del semen

El semen se conserva con el objeto de aprovechar al máximo los espermatozoides contenidos en el eyaculado de un verraco; El eyaculado de 200 ml con una concentración de  $5 \times 10^9$  espermatozoides/mm<sup>3</sup> contiene cinco mil millones de células germinales; por eso el semen se debe conservar en refrigeración, siendo necesario para ello el uso de diluyentes si se quiere prolongar la viabilidad espermática (VETEFARM, 2011).

En uno de sus trabajos, PURSEL (1975); Indicó que otro factor importante en la preservación de la calidad del semen es la temperatura, la cual debe reducirse de forma gradual una vez que el semen fue diluido. La reducción de la temperatura debe hacerse en 2 o 3 horas hasta que el semen alcance la temperatura ideal para su conservación, la cual es de 17°C, variaciones de 1 o 2 °C pueden afectar la calidad del semen, ya que el semen porcino es particularmente sensible a los cambios térmicos.

La disminución de la temperatura induce una disminución del metabolismo y de la motilidad espermática. También contribuye a frenar el crecimiento bacteriano (ALEMAN *et al.*, 2007).

## 2.7. Diluyentes

Diluyente es la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir la dosis necesaria, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado del semen, el semen se diluye con el objeto de aprovechar al máximo los espermatozoides contenidos en un eyaculado. A la vez, se pretende proporcionar un medio que conserve la vida y la capacidad fecundante del espermatozoide el mayor tiempo posible contribuyendo a mantener las funciones de nutrición, regulador de pH , controlador de presión osmótica y como antibiótico para la supervivencia de los espermatozoides (FUENTES *et al.*, 2005).

Hoy en día, el 65% de las inseminaciones artificiales porcinas en el mundo se practican con semen diluido y el 85% se realizan de 1 – 2 días después de la colecta del semen. El tipo de dilución a utilizar depende del momento en que se va a inseminar, ya sea en el momento de extracción del eyaculado o en futuras inseminaciones (PRERA, 2002).

El semen se diluye para aprovechar al máximo los espermatozoides contenidos en un eyaculado. Para que haya una fecundación debe haber cinco mil millones de espermatozoides con movimiento de propulsión hacia adelante, esto supone una proporción del 80% de espermatozoides móviles como mínimo. Con un eyaculado pueden efectuarse 10 inseminaciones, o sea que cada cerda recibe 20 ml de eyaculado.

### 2.7.1. Funciones del diluyente

Para llevar a cabo su misión, GADEA (2007) comenta que, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa) entre la principal pero también se considera a la sacarosa, la protección frente al shock térmico por frío, el control del pH del medio (Bicarbonato), lo que permite mantener la estabilidad entre lo básico y lo ácido en la utilización de los nutrientes, la presión osmótica (sales NaCl, KCl), la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos) que protegen a los espermatozoides de agentes bacterianos y sobre todo, aumentar el volumen del semen:

**Nutrientes**, el espermatozoide tiene capacidad de producir 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 nutrientes es la glucosa, aunque se han usado otras (galactosa, fructuosa o trehalosa) sin que los resultados hayan superado a la glucosa.

**Regulación de 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, por eso 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 limitada sustancias alcalinas que proporciona un ambiente químico (pH básico) adecuado para una acción enzimática que ayuda en mantener el metabolismo de las células para su posterior fertilización.

**Presión osmótica**, el espermatozoide porcino presenta una presión osmótica de 290 o 300 mosm, y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastantes amplias (240 a 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 cualquier caso para regular la presión osmótica se utiliza sales inorgánicas como cloruro sódico y potásico por tener propiedades coligativas a sus disoluciones.

**Utilización de antibióticos**, 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 diluyente es necesario añadir antibióticos, ya que los componentes del diluyente (glucosa) así como la temperatura a las que se la conservan las dosis (15 – 16 °C), permiten el crecimiento de la mayoría de las bacterias gram negativas entre las que se incluyen (*E. coli*, salmonella y pseudomonas).

## 2.8. Diluyentes para refrigeración

Los diluyentes para refrigeración son soluciones acuosas tamponadas a las que se les añade una fuente de energía (glucosa, fructuosa) y un crioprotector no penetrante, (leche descremada, yema de huevo, agua de coco) algunos diluyentes de refrigeración incorporan antioxidantes o agentes quelantes de manera experimental estas sirven para mantener las propiedades fisicoquímicas de los espermatozoides y ayudan en su metabolismo de la misma (HAMMERSTEDT, 1993).

### 2.8.1. Leche de vaca

La utilización de leche de vaca es un diluyente ampliamente utilizado. La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstruir, siendo esta última la más universal. Excepto en el caso de la leche UHT, las demás formas de leche han de ser calentadas hasta una temperatura de +920/+95 °C durante 8 – 10 minutos, sin llegar a hervir (tindalización), con el objetivo de anular los factores tóxicos de su fracción proteica (MAXWELL y EVANS, 1990).

GUERIN *et al.*, (1990) indica que, el diluyente a base de leche descremada reconstituida utilizado en la refrigeración de semen caprino es el de Corteel, con buenas propiedades conservantes a una temperatura de + 15 °C, aunque se muestra ineficaz a +50 °C, siendo de complicada elaboración y conservación.

### 2.8.2. Yema de huevo

La otra gran alternativa como dilutor externo la constituye la yema de huevo. Los huevos han de ser frescos, desde la puesta hasta el momento de su utilización (MAXWELL y EVANS, 1990), obtuvieron resultados de motilidad masal en porcinos  $\geq 3$  (buena), se puede utilizar yema de huevo desecada para la realización de los diluyentes (MONTERO *et al.*, 1995).

### 2.8.3. Agua de coco

La utilización del agua de coco como diluyente se presenta como un método alternativo en la conservación del semen caprino. Dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos, se ha demostrado que el agua de coco favorece la conservación del semen caprino, la movilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en semen caprino congelado a  $-40^{\circ}\text{C}$  con agua de coco son significativamente superiores a los obtenidos con leche. La supervivencia espermática, está alrededor de las 60 horas en agua de coco frente a las 12 horas en un medio de leche (NUNES, 1993).

La solución a base de agua de coco es un medio rico en nutrientes, de bajo costo, que ha sido utilizado con experimentos para la conservación de semen porcino in vitro (TONIOLLI *et al.*, 1998) Para el estudio in vitro. Todos los eyaculados presentaban las cualidades exigidas para su utilización en IA: motilidad masal ( $\geq 3,0$ ), porcentaje de espermatozoides vivos ( $\geq 75\%$ ) y anomalías morfológicas ( $\leq 40\%$ ).

En bovinos se obtuvo motilidades iniciales de 80% en trabajos realizados con agua de coco como diluyente para semen de bovino (ESPINOZA, 1974) en caprinos (FERREIRA, 1993), obtuvo motilidades entre 82 % y 87 % diluidos por 120 minutos en agua de coco y canino (SOARES, 2001) obtuvo motilidades mayores a 90 % en un inicio de su trabajo diluido. El agua de coco como dilutor de semen extendido es utilizada con frecuencia en granjas porcinas de la Región Noreste del Brasil (TONIOLLI *et al.*, 1998) y muestran efectos benéficos, evidenciados *in vitro* sobre las características de motilidad espermática, e *in vivo* sobre los parámetros de fertilidad (TONIOLLI *et al.*, 1997).

KRIKORIAN (1990), indica, que el agua de coco es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos, tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el agua de coco es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los minerales que contiene son indispensables, también se ha identificado 2.5% de azúcares, adicionalmente se encuentra en ella nitrógeno no proteico soluble en forma de aminoácidos, la utilización del agua de coco como diluyente se presenta como un método alternativo en la conservación del semen dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos (NUNES y SALGUEIRO, 1998).

#### 2.8.4. BTS (solución de descongelamiento Betsville)

PURSEL (1975), elaboro el extensor BTS es un extensor de corta duración, sus siglas corresponden a Betsville Thawing Solution o solución de descongelamiento Betsville , V.G. Pursel y L. A. 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 de verraco que luego va ser utilizado en la inseminación artificial, uno o dos días después de la colecta, los principales ingredientes de este extensor son: la glucosa, citrato sódico, bicarbonato de sodio, EDTA (ácido etilendiamino-tetra-acético), y el cloruro potásico que cumplen funciones de nutriente, controlador de pH, función tampón, y regulador de presión osmótica .

#### 2.9. Agua de coco

COSTE (1969), manifiesta que el agua de coco es un hidratante natural que no perderá ninguna de sus características al ser empacado para exportar sin refrigeración, el agua tiene una vida en aquel de nueve meses, siempre y cuando no se abra. El fruto es una drupa de tres caras, de 20 a 30 cm de diámetro, que pesa alrededor de 1.5 kg, con epicarpio brillante, mesocarpio fibroso de color castaño a rojizo y endocarpio lignificado o nuez que encierra una sola semilla, el endospermo o reserva alimenticia de la semilla está formado por una porción carnosa y un jugo lechos dulce, denominados respectivamente como carne y agua de coco (QUERO ,1994).

El agua de coco que también corresponde al endospermo de la fruta, constituye el 21.6% del total de la nuez y la cantidad de agua que puede ser extraída varía de 133 a 524 ml/coco (OVALLES, 2002).

#### 2.9.1. Composición del agua de coco

El agua de coco que también corresponde al endospermo de la fruta, constituye el 21.6% del total de la nuez y la cantidad de agua que puede ser extraída varía de 133 a 524 ml/coco (PHILIPPINE COCO NUTRE SEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION, 1983).

TAVARES(2006), manifestó que el coco tiene un rango de variación del volumen de agua, pH, acidez del agua de coco verde de seis variedades enanas seleccionadas de la quinta al doceavo mes de maduración, donde el volumen de agua: del quinto al octavo mes varía entre 125 ml a 246 ml y del noveno al doceavo mes varía entre 130 ml a 152 ml, también para pH ; afirma que el pH del quinto al octavo mes va de 4.7 a 5.0 y del noveno al doceavo mes va de 6.7 a 6.1, así mismo la acidez entre el quinto y el octavo mes está entre 1 a 1.5 (ml de sol. Normal/ 100 ml) y del noveno al doceavo mes de 0.4 a 0.5 (ml de sol. Normal/ 100 ml).

REATEGUI(2003), indica que la caracterización físico-química promedio del agua de coco por variedad son valores promedios obtenidos en la caracterización físico químico del agua de coco como el pH: en la variedad amarillo es de 5.25 y en la variedad verde es de 5.26; en la acidez en la variedad amarillo es de 9.3 y en la variedad verde es de 7.7; en lo que

corresponde a carbohidratos (%) en la variedad amarillo es de 4.5 y en la variedad verde es de 4.9; en azúcar total(mg/100 ml) : en la variedad amarillo es de 2.9 y en la variedad verde es de 3.8 por ello es importante elegir los cocos que tengan estas características.

GRANADOS(2002), en uno de sus trabajos identifico la cantidad de azúcares, vitaminas y minerales del agua de coco donde: la sacarosa es mayor con 8.9 mg/ml a la de la glucosa que es de 2.46 mg/ml y a la fructosa que es de 2.51 mg/ml; teniendo también mayor presencia de vitaminas al ácido nicotínico (0.64 mg/100g) luego al ácido pantoténico con (0.52 mg/100 g) así mismo de los minerales presentes en el agua de coco maduro el potasio se encuentra en mayor cantidad.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco. Está considerada como bosque húmedo pre montano tropical. Geográficamente se encuentra ubicada en una longitud oeste 76°01'07" y la latitud sur 09° 17' 58", a una altitud de 660 m.s.n.m. la temperatura media inicial de 24.85°C, humedad relativa de 85%, precipitación pluvial de 3429mm distribuidas durante todo el año, siendo los meses más lluviosos octubre a abril y más seco de mayo a septiembre, ecológicamente esta zona se considera un clima tropical húmedo (SENAMHI, 2013).

El presente trabajo se realizó con una duración de 3 meses consecutivos desde setiembre a noviembre del 2012.

#### **3.2. Tipo de investigación**

El presente trabajo es una investigación de tipo experimental.

### 3.3. Animales en estudio

En la investigación se utilizaron tres verracos de diferentes razas, entre las que se usaron, un Landrace, un Belga y también un Duroc entre 3 – 5 años de edad, provenientes de la granja de la Facultad de Zootecnia. Todos ellos son usados regularmente para colecta cada dos días entre semana y su semen es comercializado a los criadores de cerdos para inseminación artificial en forma fresca, sin diluir y usado a la vez en la granja de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

### 3.4. Colección del semen

La colección del semen de porcino se efectuó por el método de la mano enguantada (HERNANDEZ, 1976) a un intervalo de dos veces por semana. El material utilizado para la colección de semen fue limpiado y esterilizado previo a la colecta, además se limpió el prepucio del verraco con agua y secado con papel toalla. Una vez en el brete, se evacuaron las secreciones del divertículo dorsal del prepucio para luego secarlo. El frasco de colecta estuvo protegido de la luz solar y a una temperatura de 35 a 37 °C, se recogió la fracción rica del eyaculado, llevándolo luego al laboratorio para su posterior análisis.

### 3.5. Análisis y evaluación de la calidad seminal

#### 3.5.1. Examen macroscópico

Es el primer análisis a realizarse sólo en la muestra fresca, con la finalidad de detectar contaminantes del semen, que podrían afectar su posterior almacenaje. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

**Aspecto:** se evaluó en todas las muestras colectadas inmediatamente a la colección. En cada muestra se observaron las siguientes características:

– Color, El color normal es de una tonalidad cremosa, si es muy claro nos indicará una escasa concentración espermática. Un color amarillento nos revelará la presencia de orina, en estos casos irá además acompañado de olor característico. Los verracos que eyaculen habitualmente con orina no deben utilizarse, ya que esta nos puede provocar fenómenos de aglutinación de los espermatozoides. Si el tono es rosáceo nos estará señalando que hay sangre en el eyaculado; aunque en un principio esto no afecta a la conservación del semen, deberemos reconocer al verraco en busca de posibles traumatismos. Tiene que ser blanco lechoso. (ALEMÁN *et al.*, 2007), el color también varía de un blanco cremoso a un blanco lechoso, pero en apariencia ha de ser opaca lo que indica una gran concentración de espermatozoides (RIVERA, 1997).

– Presencia de impurezas, la muestra de semen deben estar libre de impurezas, como rastros de tierra, pelo, etc. Para lograr esto, debemos cubrir nuestro recipiente con una gasa.

– Olor, este debe presentar un olor típico y característico del semen del verraco, neutral u olor Suigeneris, si es muy fuerte indica contaminación con orina, secreciones prepuciales o contaminación bacteriana del semen de verraco. Si percibiéramos un olor que no pertenece, indicaría contaminación con orina, fluido prepucial o alguna alteración patológica del tracto reproductivo (LLOVERAS, 2006).

– 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 (HERNANDEZ, 1976).

**Volumen**, el volumen del semen colectado varía según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco, entre 50 a 150 ml de fracción espermática y un eyaculado de 250 ml, aproximadamente (CALDERON, 1998). El volumen se determinó por el peso del frasco colector

con el semen restándole el peso del frasco vacío. El peso en gramos se considera como volumen en mililitros. Se debe tener en cuenta 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 (SINGLETON, 2001).

**pH**, el pH del semen del verraco varía de acuerdo a la porción del eyaculado, 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. El pH del eyaculado se midió utilizando tiras indicadoras (Merck, EE.UU).

### 3.5.2. Examen microscópico

**Determinación de la motilidad masal**, la evaluación de la motilidad se realizó mediante observación directa de los espermatozoides en microscopio óptico, con objetivo de 4X, con placa térmica atemperada a 37 °C. El semen se colocó en un porta objetos y se observó mediante microscopio la presencia de ondas, siendo la evaluación subjetiva de acuerdo al trabajo realizado por (CALDERON, 1998), donde se evaluó cuantitativamente mediante la vista en un conteo y se le tomó la siguiente categoría de semen según motilidad masal:

Para ondas con movimiento muy rápido se le valoró con puntuación de 5 para una categoría del semen de excelente, para ondas de movimiento vigoroso pero inferior al anterior se estimó con una puntuación de 4 con una categoría de semen de buena, para ondas de movimiento lento se le determinó

con puntuación de 3 para una categoría del semen de regular, para ondas inexistentes, pero movimiento observable en la mayoría de los espermatozoides se le valoró con una puntuación de 2 con una categoría del semen de escasa, para ondas inexistentes, pocos espermatozoides móviles se le calculó con una puntuación de 1 con una categoría del semen de deficiente; y para ondas inexistentes, espermatozoides inmóviles se le valoró con una puntuación de 0 con una categoría del semen de pésima.

**Determinación de la motilidad individual**, la evaluación se realizó mediante un microscopio óptico, la muestra se colocó en portaobjetos, calentado por 10 minutos en placa térmica atemperada a 37 °C, observándose tres campos por muestra, se determinó la motilidad promediando las observaciones. Se evaluó la calidad del movimiento teniendo en cuenta la evaluación subjetiva de acuerdo al trabajo realizado por (CALDERON, 1998).

Donde se tomó el siguiente método de evaluación de tipo de movimiento de semen según motilidad individual.

Para el tipo de movimientos con espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido se le valoró con puntuación de 5, para espermatozoides con movimiento progresivo rápido se le estimó con puntuación de 4, para espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso se le distinguió con puntuación de 3, para espermatozoides con movimientos anormales o eventualmente progresivos se le consideró con una puntuación de 2, para espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos, se le

valoró con una puntuación de 1; y para movimientos de todos los espermatozoides inmóviles, necrospermia, se le calculó con una puntuación de 0 esta evaluación se hizo para identificar si los espermatozoides tenían buena o mala calidad de movimiento

**Porcentaje de motilidad progresiva**, este parámetro determina el porcentaje de espermatozoides que se mueven en forma progresiva a un primer golpe de vista, siendo esta una medida subjetiva. Se considera que un eyaculado es de calidad si presenta al menos 75% de motilidad progresivo (HAFEZ, 2000). Se calcula como porcentaje y se puede clasificar como muy buena: 80%; buena: 60 – 80%; regular: 40 – 60%; pobre: 20 – 40% y muy pobre menos de 20% (MERK, 1993); Se determinó la motilidad del semen antes de la dilución (en fresco) y a las 24, 48 y 72 horas post dilución.

**Determinación de la concentración y morfología espermática**, Para la determinación de la concentración y morfología espermática, las muestras seminales fueron diluidas 1:100 (vol/vol) en una solución salina al 0'9 % de cloruro sódico suplementada con 0'3 % (v/v) de concentración al 37 %. La concentración espermática se determinó mediante el procedimiento de conteo celular en la cámara de Neubauer (BRAND, Alemania) determinando la cantidad de espermatozoides por mililitro de eyaculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Spz/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Spz contados}}{\text{A} \times \text{P} \times \text{FD}}$$

Dónde:

Spz = espermatozoides

A = área de la cámara de conteo

P = Profundidad de la cámara de conteo

FD = Factor de dilución usado (1:100)

La morfología espermática se evaluó mediante microscopía de contraste de fases (objetivo de 40x). De cada muestra seminal se evaluó la morfología de 200 espermatozoides clasificándolos en dos categorías: con morfología normal o anormal. Los resultados se expresan como el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

**Determinación del porcentaje espermatozoides vivos y muertos,** Para determinar esta característica se utilizó el método de coloración con eosina que diferencia los espermatozoides vivos y muertos, la cabeza de los espermatozoides muertos se tiñe de rosado, mientras que los moribundos, se tiñen solo la parte caudal (HOLY, 1987). La captación de color se debe a un daño en la membrana celular del espermatozoide que permite la captación del colorante (eosina), mientras que las paredes que no estén dañadas no aceptan el colorante. Se siguió el siguiente protocolo:

Se toma un portaobjetos y se coloca una gota de semen y otra de preparación de eosina atemperada a 37 °C, se mezclan ambas gotas usando el

canto de otro portaobjetos y con este mismo se extiende la preparación dejando una fina capa cubriendo el primer portaobjetos, se deja secar al aire; Una vez seco, lo observamos al microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

El número total de espermatozoides contabilizados fue de 200, representativo de la población total.

### 3.6. Dilución y conservación del semen

**Preparación del agua de coco**, se recolectaron el agua proveniente de tres frutos frescos del cocotero, luego se procedía a calentarlos al punto de ebullición (105 °C) por cinco minutos, dejándolo enfriar hasta los 37 °C, adicionándole 1 gr de penicilina sódica (1'000,000 UI, Pharma Gen) por litro, para luego proceder a usarlo.

**Preparación de la solución de agua de coco**, se preparó el dilutor a base de agua de coco, elaborado en base a composiciones de otros trabajos realizados (KOTZIAS, 1999; FURTADO y VANINI, 1998): Agua de coco 500 ml + citrato sódico 1.25 gr ó 250 ml + agua destilada 250 ml + 1 gr de penicilina (1'000,000 UI, Pharma Gen).

**Preparación del diluyente comercial BTS, (solución de descongelamiento Betsville)** fórmula ideada por PURSEL Y JOHNSON (1975), es un extensor de corta duración, sus siglas corresponden a Betsville Thawing Solution o solución de descongelamiento Betsville.

El diluyente comercial BTS fue adquirido de la empresa Kubus y se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Preparados los dilutores se hicieron las mezclas respectivas antes de diluir el semen, la dilución estuvo en función de la concentración espermática determinada y el volumen del eyaculado, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ Dosis} = \frac{\text{CS} \times \text{Volumen de eyaculado} \times \% \text{ Mot}}{\text{N}^\circ \text{ Spz/dosis} \times 100}$$

$\text{Vol. Total} = \text{N}^\circ \text{ Dosis} \times \text{Volumen de la dosis de inseminación (100 ml)}$

$\text{Vol. Dilutor} = \text{Vol Total} - \text{Vol del Eyaculado}$

Dónde:

CS = Concentración espermática (spz/ml)

% Mot = porcentaje de motilidad

$\text{N}^\circ \text{ Spz/dosis} = \text{Cantidad de espermatozoides por dosis seminal (3} \\ \times 10^9 \text{spz/dosis).}$

$\text{Vol. Total} = \text{Volumen total (volumen del dilutor y del semen)}$

$\text{Vol. Dilutor} = \text{Volumen del dilutor.}$

### 3.7. Variables independientes

- Tiempo de conservación post dilución (24 horas).
- Dilutor (agua de coco) en refrigeración a 16 °C.

### 3.8. Tratamientos en estudio.

- T0 = BTS 100 % + semen
- T1 = Diluyente agua de coco 100 % + semen
- T2 = Solución de agua de coco 100 % + semen
- T3 = Diluyente agua de coco 60 % + 40 % de BTS + semen
- T4 = Diluyente agua de coco 40 % + 60 % de BTS + semen
- T5 = Solución de agua de coco 60 % + 40 % de BTS + semen
- T6 = Solución de agua de coco 40 % + 60 % de BTS + semen

### 3.9. Croquis de distribución del tratamiento

Cuadro 1. Croquis de distribución del tratamiento

Dilutores a 16 °C	Tiempo (h)/Conservación
	24 h
T0= BTS* 100 %	r1 + r2 + r3
T1= DAC** 100%	r1 + r2 + r3
T2= SAC*** 100 %	r1 + r2 + r3
T3= DAC 60 % + BTS 40 %	r1 + r2 + r3
T4 =DAC 40 % + BTS 60 %	r1 + r2 + r3
T5= SAC 60 % + BTS 40 %	r1 + r2 + r3
T6 = SAC 40 % + BTS 60 %	r1 + r2 + r3

\* Betsville Thawing Solution

\*\* Diluyente Agua de coco

\*\*\* Solución agua de coco

### 3.10. Análisis estadístico.

La información recogida de cada verraco fue evaluado mediante un diseño completamente al azar, los animales fueron distribuidos en un diseño completamente al azar (DCA); con 6 tratamientos y 3 repeticiones; la unidad experimental estuvo conformada por cada eyaculado. Los resultados fueron analizados en cada variable mediante el análisis de varianza con el programa estadístico INFOSTAT (versión 2008).

El modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = J-ésima observación del i-ésimo nivel de exposición de calidad seminal a diferentes tiempos (0 horas ,24 horas).

$\mu$  = Media poblacional

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento (dilutores).

$e_{ij}$  = Error experimental.

Las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para las variables en estudio se establecieron mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), en variables paramétricas y prueba de Kruskal Wallis en variables no paramétricas para estudiar las relaciones existentes entre las variables involucradas.

### 3.11. Variables dependientes

– **Dilución**, se determinó la dilución que dio mejor calidad espermática en el semen porcino.

– **Porcentaje de motilidad**, se determinó la motilidad en cinco momentos: Antes de la dilución del semen: muestra fresca, a las cero horas las

24 horas pos dilución. Así mismo se evaluó, dentro de cada momento, las motilidades a los 10 y 30 minutos post calentado a 37°C.

– **Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos**, se determinó cuantitativamente en porcentaje, mediante el conteo de 200 espermatozoides, se considera valor normal de 75 a 90% de espermatozoides vivos, teniendo un valor límite de 60%, que se tomará en cuenta previo a la dilución. La determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se realizó de similar manera que para el porcentaje de motilidad (24, horas post dilución) y dentro de cada momento a los 10 y 30 minutos post calentado a 37°C.

– **Costos**, se determinó el costo de cada uno de los tratamientos usados.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Evaluación seminal previa a la dilución del conjunto de semen**

La evaluación previa a la dilución se realiza con la finalidad de descartar los eyaculados que estén por debajo de los estándares establecidos en el capítulo anterior y para determinar la cantidad de dosis de inseminación a preparar. El cuadro 2 muestra la calidad seminal previa a la dilución del semen de las tres evaluaciones realizadas, presentando las características macroscópicas y microscópicas de la mezcla del semen analizado, en todos los casos presentaron buenas características seminales.

### **4.2. Evaluación de la calidad seminal post dilución y almacenado**

#### **4.2.1. Evaluación morfológica post dilución**

Los datos de la evaluación morfológica presentados en el cuadro 3 fueron realizados a 10 minutos luego de la dilución, con la finalidad de determinar si estos diluyentes confieren algún daño a los espermatozoides, comparados con el dilutor comercial, del cuadro no se hallaron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 2. Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de verracos utilizados en el experimento pos mezcla y dilución

Características macroscópicas y microscópicas	EVALUACIONES		
	1ra	2da	3ra
Volumen (ml)	418	440	385
pH	7	7	7
Color	Blanco lechoso	Blanco lechoso	Blanco lechoso
Olor	Característico	Característico	Característico
Motilidad masal (0-5)	4-5	4-5	4-5
Motilidad progresiva individual (%)	80 %	80 %	80 %
Concentración (espermatozoides/ml)	$1.78 \times 10^9$	$1.78 \times 10^9$	$1.73 \times 10^9$
Viabilidad (%)	85%	81%	92.5%

Cuadro 3. Evaluación de las características morfológicas del semen de verracos en el experimento post mezcla y dilución

Tratamiento	MORFOLOGÍA (%)	
	NORMALES	ANORMALES
BTS	77.7	22.3
AC	80.3	19.7
SAC	81.3	18.7
AC 60 + BTS 40	79.7	20.3
AC 40 + BTS 60	82.0	18.0
SAC 60 + BTS 40	85.7	14.3
SAC 40 + BTS 60	79.7	20.3

#### 4.2.2. Porcentaje de motilidad progresiva individual de los espermatozoides a las 0 horas y 24 horas post dilución.

Las evaluaciones de motilidad realizadas en diferentes momentos post dilución nos llevaron a evaluar sólo dos momentos, a las cero horas y 24 horas post dilución, debido a que las motilidades registradas posteriormente (48 y 72 horas) fueron muy bajas (< a 20% de motilidad), datos que no permitían una correcta evaluación estadística, y desde luego biológicamente motilidades de ese tipo no son usables para la inseminación. El efecto de las diferentes diluciones sobre la motilidad progresiva del eyaculado a las cero y 24 horas post dilución se observa en el cuadro 4, en cada evaluación se realizaron dos registros, a los 10 y 30 minutos post calentado en baño maría a 37°C. De la evaluación realizada, se reportan diferencias significativas de acuerdo a las horas de evaluación, siendo mayor a las cero horas donde los tratamientos mantienen rangos permitidos para inseminación y a las 24 horas hay diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) donde a los 10 min el AC 60 + BTS 40 es el mejor y a los 30 minutos el BTS Y AC 60 + BTS 40 son los mejores.

A las cero horas no se reportaron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ) ni por el tipo de dilutor empleado ni el tiempo de la evaluación, mientras que a las 24 horas si hubo diferencias significativas, ya sea por el dilutor empleado como por el momento de la evaluación (10 ó 30 min) (figura 1).

Cuadro 4. Efecto de los dilutores empleados sobre la motilidad progresiva individual, a las cero y 24 horas.

Tratamiento	Cero horas		24 horas	
	10min	30min	10min	30min
BTS	80.00	80.00	50.00 ± 10.00 <sup>abc</sup>	80.00 ± 0 <sup>a</sup>
AC	80.00	80.00	40.00 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	63.33 ± 5.77 <sup>bc</sup>
SAC	80.00	80.00	43.33 ± 5.77 <sup>abcd</sup>	63.33 ± 5.77 <sup>bc</sup>
AC 60 + BTS 40	80.00	80.00	60.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	66.67 ± 5.77 <sup>ab</sup>
AC 40 + BTS 60	72.00	75.00	53.33 ± 5.77 <sup>b</sup>	60.00 ± 0.00 <sup>bcd</sup>
SAC 60 + BTS 40	72.00	75.00	23.33 ± 15.28 <sup>cd</sup>	50.00 ± 10.00 <sup>cd</sup>
SAC 40 + BTS 60	73.00	75.00	13.33 ± 5.77 <sup>d</sup>	46.67 ± 5.77 <sup>d</sup>

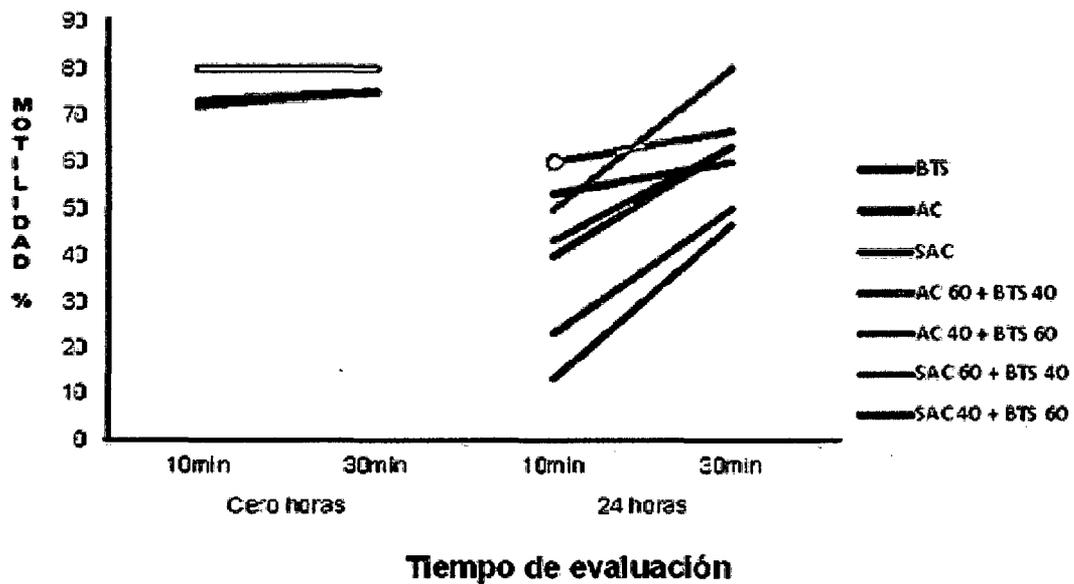


Figura 1. Efecto de los dilutores empleados sobre la motilidad progresiva individual, a las cero y 24 horas post dilución del semen.

#### 4.2.3. Efecto de los dilutores empleados sobre la viabilidad de los espermatozoides, a las cero y 24 horas de evaluación.

Del mismo modo que sucedió con la evaluación de la motilidad en diferentes momentos, registrando motilidades muy bajas a las 48 y 72 horas post dilución, los porcentajes de viabilidad siguieron el mismo patrón, por lo tanto esos datos no fueron considerados para el análisis estadístico. El efecto de los dilutores sobre el porcentaje de viabilidad se muestran en el cuadro 5 y la figura 2, donde se nota a las 24 horas, mejores viabilidades con el dilutor comercial a los 30 minutos de calentada la muestra, pero sin mostrar diferencias estadísticas significativas con los dilutores de AC, SAC y la mezcla de AC 60% + BTS 40%.

Cuadro 5. Efecto de las diluciones sobre la viabilidad a las 0 y 24 horas

Tratamiento	Cero horas		24 horas	
	10 min	30min	10 min	30 min
BTS	80.00	83.00	31.67 ± 2.89 <sup>a</sup>	70.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
AC	70.00	75.00	26.67 ± 5.77 <sup>a</sup>	55.00 ± 2.89 <sup>abc</sup>
SAC	70.00	77.00	28.33 ± 2.89 <sup>a</sup>	58.33 ± 7.64 <sup>ab</sup>
AC 60 + BTS 40	80.00	80.00	26.67 ± 7.64 <sup>a</sup>	61.67 ± 8.66 <sup>a</sup>
AC 40 + BTS 60	72.00	72.00	31.67 ± 7.64 <sup>a</sup>	50.00 ± 0.00 <sup>abc</sup>
SAC 60 + BTS 40	60.00	70.00	36.67 ± 5.00 <sup>a</sup>	40.00 ± 16.07 <sup>bc</sup>
SAC 40 + BTS 60	60.00	67.00	25.00 ± 15.28 <sup>a</sup>	38.33 ± 15.28 <sup>c</sup>

Valores promedios con diferentes letras en una misma columna indican que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

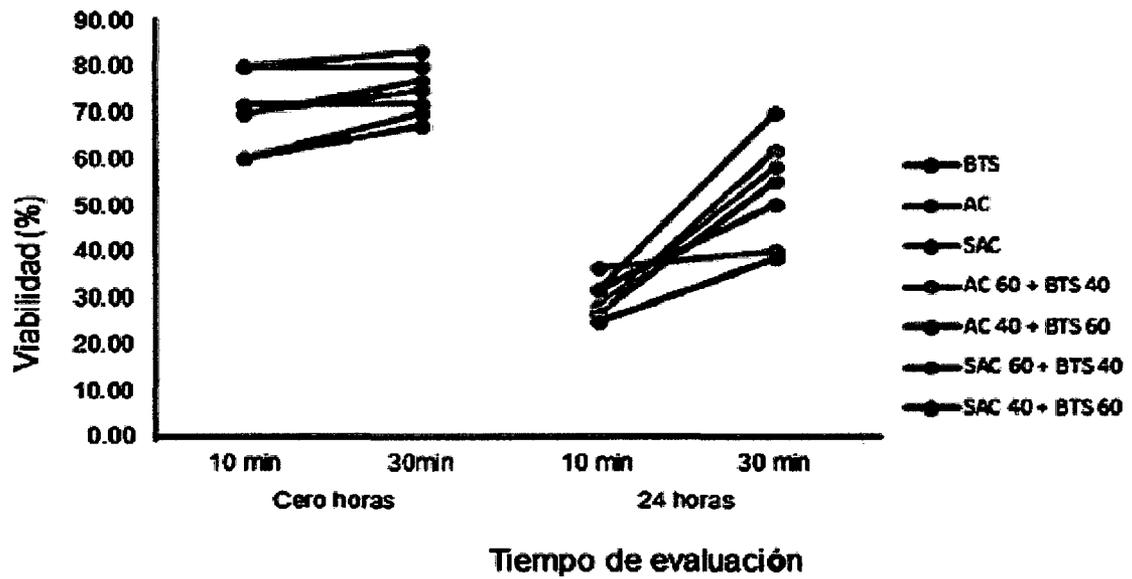


Figura 2. Efecto de los dilutores empleados sobre la viabilidad (%), a las cero y 24 horas post dilución del semen

#### 4.3. Costos del uso de los dilutores utilizados con coco

El costo de cada dilutor empleado, se muestra en el cuadro 6, donde se aprecia que el dilutor comercial llega a ser el más caro, pero al mismo tiempo la preparación del mismo es más práctico y rápido, pero más difícil de conseguir en nuestra zona, la ventaja del agua de coco, es por la abundancia que hay en la zona, que la hace de fácil adquisición donde se aprecia que su precio está en S/. 8.50 para uso de dilutor de agua de coco.

Cuadro 6. Costo de los productos por tratamientos elaborados como dilutores

	BTS	AGUA DESTILADA	COCO HERVIDO	CITRATO DE SODIO	PENICILINA	TOTAL	AC 60 + BTS 40	AC 40 + BTS 60	SAC 60 + BTS 40	SAC 40 + BTS 60
BTS	25.00	10.00				35.00	14.00	21.00	14.00	21.00
AC			6.50		2.50	8.50	5.10	3.40		
SAC		2.50	3.50	0.60	2.50	9.10			5.46	3.54
						<b>TOTAL</b>	19.1	24.4	19.46	24.6

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Evaluación seminal antes de la dilución

El gran aumento en la productividad en porcinos (PRERA, 2002; BECERRIL, 2004) ha conllevado a que la tecnología de conservación de semen, sea más eficiente, así la evaluación seminal antes del procesado es importante, nos sirve para descartar el eyaculado de baja calidad y no apto, y determinar las dosis seminales (HAFEZ, 2000).

Los eyaculados empleados en nuestro estudio cumplían con las cualidades exigidas para su utilización en la inseminación artificial, colectando sólo la fracción 2 del eyaculado, que es la adecuada para procesarla (LAURENTIN Y LORDAN, 2004 y ENOS, 1960).

Las características macroscópicas analizadas en cada verraco cumplían con los parámetros establecidos, como en el volumen del eyaculado, donde registraron volúmenes entre 100 a 350 ml que es un rango normal (LORDAN, 2004; HAFEZ, 2000 y CALDERON, 1998), así también el pH 7 estuvo entre los valores normales (GADEA, 2007) y MAQUEDA, 2006), en relación al olor presentaron un olor sui generis (LLOVERAS, 2006 Y LORDAN, 2004) típico del cerdo, variando en el color de gris a crema (ALEMÁN *et al.*, 2007) o de un blanco cremoso a un blanco lechoso RIVERA, (1997).

Evaluadas las características macroscópicas y cumpliendo con los parámetros normales, se procede luego a evaluar las características microscópicas; dentro de ellas, la motilidad espermática constituye una de las más importantes, así los verracos evaluados presentan motilidades mayores a 75%, que es considerado adecuado para su dilución y su uso en la inseminación artificial (TONIOLLI, 1998 y MAXWELL Y EVANS , 1990, HAFEZ, 2000), del mismo modo la evaluación de la calidad masal es importante, considerando que nuestro trabajo tuvo como resultados entre 4-5 y como óptimo se requerían valores  $\geq 3$  (HAFEZ, 2000).

La concentración espermática toma importancia en la preparación de las dosis seminales para su dilución y posterior uso (VETEFARM, 2011), en relación a este aspecto; (HAFEZ, 2000) indica que solo se utilizaran concentraciones de volúmenes libres de fase pre y post espermática, que constituye la fracción rica del eyaculado, donde nosotros obtuvimos una concentración de  $1.78 \times 10^9$  así en las dosis seminales para IA se debe lograr una cantidad mayor a  $2,5 \times 10^9$  de espermatozoides motiles (sin importar el extensor), pero usualmente se requieren dosis seminales con un conteo de espermatozoides totales entre  $3.0$  a  $3.5 \times 10^9$  de espermatozoides motiles.

## **5.2. Efecto de los dilutores sobre la motilidad progresiva individual**

Los dilutores deben cumplir la función de aumentar el volumen y preservar la viabilidad del eyaculado, por lo tanto debe añadirse un medio adecuado (LANDSVERK, 2000; FUENTES *et al.*, 2005), que de algún modo

simule las características del plasma seminal en composición y características físicas (NISHIKAWA, 1964).

El porcentaje de motilidades progresivas individuales registradas en semen fresco nos sirve de base para las subsiguientes evaluaciones post dilución. A diez minutos después de la dilución se evaluó el semen con la finalidad de comprobar la inocuidad de los dilutores, el cual se mantiene en un porcentaje óptimo con motilidad progresiva entre 75 a 80% (TONIOLLI *et al.*, 1997).

Se ha observado en diferentes investigaciones las bondades del agua de coco en la conservación de semen de diferentes especies domésticas y silvestres (FURTADO y VANINI, 1998; KOTZIAS, 1999), así ESPINOZA (1974) ya que tiene una buena capacidad de amortiguación y buen contenido de nutrientes (KRIKORIAN, 1990; BALBACHAS, 1998; COSTÉ, 1969; QUERO ,1994; REATEGUI, 2003), en trabajos hechos en bovinos utilizando agua de coco obtuvo motilidades post dilución de 70 %, así mismo SOARES (2001) reporta en un trabajo para conservar semen canino con agua de coco adicionado yema de huevo, mantienen una motilidad progresiva individual de 90% post dilución.

Mientras que FERREIRA (1993) en trabajos utilizando el agua de coco para conservar semen caprino reportó motilidades iniciales de 82%, estos reportes coinciden con lo registrado en nuestra investigación, y nos indica que el agua de coco conserva muy bien las motilidades hasta 24 horas de diluido el

semen, ya que mantiene la motilidad progresiva individual con porcentajes óptimos para ser usados en IA.

Se observó que los espermatozoides evaluados a 10 minutos post calentado en baño maría, mantienen bajo sus porcentajes de motilidad (13 a 60%), que nos indica la influencia de la refrigeración a la que ha sido expuesta, logrando incrementar dicha motilidad a los 30 minutos, es así que se observan que hay diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), siendo los tratamientos control T0 y T3 que logran mejores porcentajes de motilidad (80.00 y 66.67%), y los de menor motilidad el T5 y T6 (50.00 y 46,67%); donde el valor medio óptimo de motilidad oscila en un 60 a 80%, siendo sus motilidades óptimas para la inseminación artificial (TONIOLLI *et al.*, 1998 y FERREIRA, 1993).

### 5.3. Efecto de las diluciones sobre la viabilidad de los espermatozoides a las 0 y 24 horas.

Los dilutores usados en el trabajo son considerados de refrigeración (HAMMERSTEDT, 1993) dentro de los cuales se encuentran la leche de vaca (GUERIN, 1990), yema de huevo (MAXWELL y EVANS, 1990 y MONTERO *et al.*, 1995) y el agua de coco (ESPINOZA, 1974; TONIOLLI *et al.*, 1998) han sido empleados en otras especies con éxito.

El porcentaje de viabilidad establecida al inicio de la investigación mantiene un porcentaje inicial en viabilidad a las 0 horas de entre 67 y 83 % de espermatozoides vivos, que el dilutor a la mezcla mantiene un porcentaje

óptimo de viabilidad para las dosis de inseminación. Así en trabajos de conservación de semen en bovinos utilizando agua de coco, lograr porcentajes de espermatozoides viables del 80% (LORDAN, 2004, TONIOLLI *et al.*, 1998 y ESPINOZA, 1974).

Del mismo modo SOARES, (2001) en trabajos realizados para conservar semen de perros con el uso del agua de coco y yema de huevo lograron obtener una viabilidad de 70%, esto corrobora el hecho que no existe, al inicio de la dilución un efecto de la dilución sobre la viabilidad, manteniendo porcentajes óptimos para las dosis de inseminación, similar comportamiento se observa a las 24 horas de evaluación a los 10 minutos, incrementando luego a los 30 minutos su motilidad, que cuando expresan su mejor motilidad post calentado. Referente a la viabilidad, evaluada a las 24 horas se observa que a los 30 minutos diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), siendo los tratamientos control T0 y T3 tener mejores porcentajes, manteniendo un promedio de 70% y 61,67% de viabilidad, siendo del mismo modo los tratamientos con menor viabilidad el T5 y T6 con 40% y 38.33% de viabilidad respectivamente, lo que nos indica que el dilutor BTS y el dilutor preparado con AC 60 + BTS 40 tener viabilidades óptimas a las 24 horas para dosis de inseminación artificial (TONIOLLI *et al.*, 1997; LORDAN ,2004 y PURSEL,1975).

#### 5.4. Costo de los dilutores

El uso del agua de coco, como dilutor indudablemente reduce los costos de la inseminación, disminuyendo el costo por litro de preparación en aproximadamente veintiséis nuevos soles (S/. 26.00), respecto al uso del dilutor comercial. El volumen promedio de agua de coco obtenido por fruto fue de 300 a 500 ml aproximadamente, tal como se reporta en la bibliografía (OVALLES, 2002; PHILIPPINE COCO NUTRE SEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION, 1983), es así que se empleaba unos 2 a 4 cocos para un litro. Esto se observa en varios trabajos realizados, ya sea para conservar el semen en refrigeración o congelado (TONIOLLI *et al.*, 1998) siendo esta una de las bondades de este producto.

## VI. CONCLUSIÓN

- Que el dilutor agua de coco puro, tiene un valor aceptable (para la motilidad de 60% y para viabilidad 50%) en conservación de semen porcino a 16°C hasta por 24 horas, con motilidad de 63.33% y viabilidad de 55%.
- Se estimó que el dilutor que resulta con la mejor motilidad progresiva individual espermática para el trabajo con semen porcino conservado a 16°C hasta las 24 horas con agua de coco fue el T3 (dilutor AC 60% + BTS 40%) (66%).
- Se determinó que el dilutor que resulta con la mejor viabilidad espermática para el trabajo con semen porcino conservado a 16°C hasta las 24 horas con agua de coco fue T3 (AC 60% + BTS 40%) (61.67%).
- Se calculó que los costos de usar el dilutor de agua de coco (*Cocus nucifera* L.) para la conservación de semen porcino, en refrigeración a 16°C, resulta más económico (S/. 8.50) esto para T1 (Diluyente agua de coco) que los demás dilutores evaluados.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar el uso del dilutor de agua de coco en trabajos de fertilidad en campo.
2. Determinar el tiempo de almacenamiento del agua de coco en refrigeración (4°C) para ser usado como dilutor.
3. Realizar estudios de conservación de semen diluidas en agua de coco en otras especies, como aves y animales silvestres.

## **BOAR SEMEN PRESERVATION IN COOLING USING COCONUT WATER AS EXTENDER IN TINGO MARIA**

### **ABSTRACT**

Artificial insemination (AI) implementation in Peruvian jungle in small pig breeding still faces some problems, as the availability of good boar semen, the use of commercial extenders and the absence of AI technicians. In order to evaluate the response of boar semen preservation in cooling (16°C), using coconut (*Cocos nucifera* L.) water as a extender, this research was implemented in the National Agrarian University of Forest located in Rupa Rupa district, Leoncio Prado province, Huánuco region – Peru. Mixed ejaculates from three boars of different breeds were used, of 3-5 years old with proven fertility, semen was mixed with BTS (Betsville Thawing Solutions), coconut water solution (SAC) or coconut water extender (DAC) in different proportions. A completely randomized design was used, with seven treatments and three replicates, for mean comparison test in parametric variables Tukey test ( $p < 0.05$ ) was used and for nonparametric variables Kruskal Wallis, to process data INFOSTAT (free version) software was used. The results show that T2 (DAC), has an acceptable value for motility (63.33%) and viability (55%) to preserve boar semen at 16 °C up to 24 hours, likewise, it was determined that T3 ( DAC 60% + 40% BTS) obtained similar motility (66%) and viability (61.67%) to that obtained by commercial extender (T0 = BTS). Also the costs to use DAC (T1) for boar semen preservation, cooling at 16 °C, it is more economical (S / . 8.50) than the other diluters evaluated.

In conclusion, it is feasible to use coconut water as boar semen extender up to 24 hours of cooling at 16°C.

**Keywords:** Conservation, semen, cooling, extender, coconut water, *Cocos nucifera* L., motility and viability.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEMAN, D; ALFARO, M; HURTADO, E. 2007. Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas [En línea] <http://www.ceniap.Gov.Ve/pbd/revistascientificas/Zootecniatropical/zt2502/arti/Antoni.htm>, consultado 19 febrero del 2012).
- BECERRIL, Á. 2004. Manejo del semen: desarrollo de los programas de inseminación artificial. [En línea] <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar017> , consultado 19 febrero del 2011).
- BONADONNA, M. 1938. Tecnología de la reproducción, inseminación artificial en cerdos.
- CALDERON, O. 1998. Primer curso de inseminación artificial y reproducción del ganado porcino.
- COSTE, R. 1969. El cocotero. Ed. Blume. Madrid- España 69 p.
- ENOS, J. 1960. The artificial insemination of farm animals. 4ed. New Jersey, US, Rutgers.473 p.
- ESPINOZA, A. 1974. Tesis Unas (Universidad Nacional Agraria De la Selva, zootecnia. Conservación de semen de bovino a temperatura ambiente con el dilutor agua de coco en condiciones de selva, Tingo María-Perú.
- FERREIRA, J. 1993. El agua de coco in natura integral y adicionada con citoquinas como dilutor de semen caprino. Universidad Estadual de Ceara, Brasil.

- FUENTES, P y GADEA, J y Mc DONALD, L. 2005. Resultados experimentales en el manejo reproductivo del verraco. Valencia, VE. [En línea] [www/ceniap.gov.ve/bdigital/verracomonografia.htm](http://www/ceniap.gov.ve/bdigital/verracomonografia.htm), 2 de diciembre de 2010).
- FURTADO, E.; VANINI, G. 1998. Inseminación artificial de Eguas Percheron e Bretao con semen diluido en agua de coco y leche pos destetado.
- GADEA, J .2007. Los diluyentes de inseminación artificial porcina [en línea];([http://www.engormix.com/s\\_articles\\_view.asp?art=281](http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=281), Universidad de Murcia, España. Consultado 19 mar. 2008).
- GUERIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BENIGNI, A. 1999. In vitro capacitation of dog sperm assessed by chlortetracycline staining. 52; 617-628p.
- GRANADOS, D. 2002. Manejo de la palma de coco en Mejioco. Edit. Rev. Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. 39 -48 p.
- HAFEZ, E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Edit. Mc Graw Hill. 7ma edit. México DF. 504p.
- HAMMERSTEDT, E. 1993. purificación de proteínas del plasma seminal ovino, capacidad reversora producida por el frío sobre los espermatozoides [En línea] <http://www/seoc/docs/w4q3jod8.pdf>, consultado 1 de may 2011 ).
- HERNANDEZ, J. 1976, Influencia del tiempo de conservación, raza, volumen y concentración sobre la motilidad del semen fresco porcino almacenado por 96h. Revista de Reproducción Animal, 2004, V 30, N 1 y 2. 75-80 p.

- HOLY, L 1987. Biología de la reproducción bovina, Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y el macho. Trad. R. Barnet. 2 ed. La Habana. Ed. Científico-Técnica. 344 p.
- NISHIKAWA, I. 1964. [En línea] <http://www.aiza.org.ar/doc/0005.pdf>. studies on the egg yolk coagulation Antoni in goat semen.
- KOTZIAS, E. 1999. Parámetros reproductivos de matrices suinos inseminados con semen diluido en agua de coco.
- KRIKORIAN, A. 1990 Cultivo de tejidos en la agricultura. Edit. A
- LANDSVERK, K. 2000. Packaging and distribution – their impact on fertility. In: International Conference on Boar Semen Preservation (L.A. Johnson y H.D. Guthrie, editors). Maryland, 137-139 p.
- LAURENTIN, R. 2001. El verraco, cuantos beneficios pudiera aportarnos, Valencia, VE. [En línea] [www//oni.escuelas.edu.ar/2002/mendoza/fedd-lot/insencer.htm](http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/mendoza/fedd-lot/insencer.htm), 3 de diciembre de 2010).
- LORDAN, M. 2004. La importancia de la inseminación en porcino [En línea] [www//vetefarm.com/ inseminación porcino](http://www/vetefarm.com/inseminación_porcino), 2 de diciembre de 2010).
- LLOVERAS, M. 2006. Inseminación artificial en cerdos. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino INTA, Argentina. 19 de julio 2012.
- MAQUEDA, L. 2006. Conservación de la calidad del semen: diluyentes, empaquetemperaturatransporte.[En línea] [www.engormix.com/conservación \\_calidad \\_semen \\_diluyentes \\_s \\_articulos \\_113 \\_POR.htm](http://www.engormix.com/conservación_calidad_semen_diluyentes_s_articulos_113_POR.htm), Consultado 20 marzo del 2011).

- MAXWELL, W. y EVANS, G. 1990. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática del semen caprino. [En línea] <http://eprints.ucm.es/tesis/19972000/X/3/X3050301.pdf> , consultado 22 de abril del 2011.
- MONTERO, N. CORTES, S TOME, A. VASQUEZ, I .1995 yema de huevo desecada como crioprotector alternativo del semen ovino vi jornada sobre la producción animal (Zaragoza) Vol. N .16, Tomo 1, 419 - 426 p.
- NUNES, J.; SALGUEIRO, C. 1998. Utilización del agua de coco como dilutor de semen de caprino y ovino. Rev. Cient. Prod. Animal. Vol.1, 17-26 p.
- NUNES, J.1993.Utilización de agua de coco como dilutor de semen de animales domésticos y del hombre Rev. , Bras. Reprod. Animal. Vol. 22; 109 – 112 p.
- OVALLES, J. 2002. Determinación del contenido nutricional del agua de coco.Rev. de farmacia. Vol.44. n.22.
- PHILIPPINE COCONUT RESERCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION, Authority. 1983, Seminar on methods of copra drying quezon city. 99 p.
- PRERA, F. 2002. Utilización de leche descremada fluida UHT de bovino como extensor de semen fresco de verracos. TesisUSAC/ FMVZ.74 P.
- PURSEL, V. 1975.Freezing of boar spermatozoa fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure.Journal of Animal. Science, 40; 90-102.
- QUERO, H. 1994. Flora de Veracruz, fascículo nº 81 PALMAE. Instituto de ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, 118 p.

- REATEGUI, D. 2003. Composición y actividad antioxidante del agua de coco de dos variedades de coco. Tesis. Ingagr.Peru, Tingo Maria.
- RIVERA, A. 1997. utilización de tres diluyentes en semen porcino para su uso a 96 y 129 horas post colecta, quito, universidad central del ecuador, facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- SENAMHI, 2013. Servicio nacional de metereologiay hidrología. [En línea] <http://www.senamhi.gob.pe/huanuco>, 13 de diciembre del 2012).
- SINGLETON, W. 2001. recolección del semen porcino, evaluación. [En línea] [www// porcicultura .com.](http://www.porcicultura.com) ↗ consultado el 10 de mayo del 2011).
- SOARES, R. 2001. Crioconservación de semen canino usando y mezclando con el dilutor agua de coco con yema de huevo y tres diferentes concentraciones de glicerol. Universidad de Ceara.Brasil.
- TAVARES, J. 2006. Rango de variación del volumen de agua, pH, acidez, solidos solubles totales (° Brix), azucares reductores y no reductores, del agua de coco verde Rev.Bras.verde de agroecologia y desenvolvimiento grupo verde de agricultura alternativa.
- TONIOLLI, R.; COUROT, M.; COMBARNIS, J. 1997. Fracción activa del agua de coco, conservación del semen del suino. Rev.Bras. Reproducción Animal. Vol. 21. Nº 3. 29-40 p.
- TONIOLLI, R.; CAVALCANTE, S.G. 1998. Evaluación en vitrio del semen del semen de suino diluido en BTS y en agua de coco en natura y estabilizada. Rev. Bras. Reproducción Animal. Vol.22. Nº. 4. 198-201 p.

VETEFARM. 2011. TECNOLOGÍA EN INSEMINACIÓN. [En línea] [www/vetefarm.com/nota.asp?not=275&sec8](http://www/vetefarm.com/nota.asp?not=275&sec8), consultado el 10 de mayo del 2012.