

## **Universidad Católica de Santa María**

**Facultad de Ciencias é Ingenierías Biológicas y Químicas**

**Programa Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**



**Efecto del Dilutor, Raza y Tiempo de Conservación sobre la Calidad Seminal y Funcional del Semen Porcino Conservado. Arequipa 2012**

**Dilutor, Breed and Time of Conservation Effects on the Seminal Quality and Functional of the Preserve Porcine Sperm. Arequipa 2012**

**Presentado por:**

Carla Paola Bustios Mendoza.

Bachiller en Medicina Veterinaria y  
Zootecnia

Tesis presentada para optar el Título  
Profesional de: Médico Veterinario y  
Zootecnista

**Arequipa – Perú**

**2012**

## DEDICATORIA

La presente Tesis, quiero dedicar a mis padres “Carlos y Leonor”, quienes me brindaron su apoyo incondicional para conseguir mis metas, y a Renato que siempre estuvo ahí conmigo y que de una u otra forma me ayudó a la realización de esta tesis.

Carla Paola Bustios Mendoza

## AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Católica de Santa María: a la facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas; al Programa Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Docentes y Personal Administrativo.
- A mi asesor Dr. Juan Reátegui Ordoñez, por su orientación y apoyo brindado en la realización del presente trabajo.
- A los Doctores Jurados: Dr. Guillermo Vásquez Rodríguez, Dr. Adolfo Hernández Tori, Dr. Jorge Zegarra Paredes, por su orientación durante la revisión del presente trabajo de investigación.
- A los Docentes y Catedráticos del Programa Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia quienes directamente han influenciado en mi profesión que gracias a sus conocimientos impartidos incondicionalmente para el desarrollo profesional.
- Al Ing. Víctor Valdivia Camargo, staff de profesionales y personal que labora en el centro, en el cual se realizó el presente estudio, por brindarme toda la ayuda posible durante la ejecución de la presente investigación.
- A los amigos y colegas por su incondicional apoyo, colaboración y consejos.

## INDICE GENERAL

<b>Resumen</b> .....	1
<b>I. Introducción</b>	
1.1. Enunciado del Problema .....	3
1.2. Descripción del Problema .....	3
1.3. Justificación del Trabajo.....	4
1.4. Objetivos .....	5
1.5. Planteamiento de la hipótesis.....	6
<b>II. Marco teórico</b>	
2.1. Análisis bibliográfico .....	7
2.2. Antecedentes de investigación.....	36
<b>III. Materiales y Métodos</b>	
3.1. Materiales .....	39
3.2. Métodos.....	41
3.3. Análisis Estadístico.....	45
<b>IV. Resultados y Discusión</b> .....	46
<b>V. Conclusiones</b> .....	59
<b>VI. Recomendaciones</b> .....	60
<b>VII. Bibliografía</b> .....	61
<b>VIII. Anexos</b> .....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

<b><u>Cuadro Nro. 1:</u></b> Valoración de la motilidad espermática. ....	13
<b><u>Cuadro Nro. 2:</u></b> Color de semen en las Razas Yorkshire y Landrace .....	47
<b><u>Cuadro Nro.3:</u></b> Volumen Promedio de semen (ml) de porcino .....	48
según raza.	
<b><u>Cuadro Nro. 4:</u></b> Concentración Promedio (espermatozoide x ml) según raza....	49
<b><u>Cuadro Nro. 5:</u></b> Motilidad Promedio de semen de porcino según el dilutor.....	51
y tiempo de conservación.	
<b><u>Cuadro Nro. 6:</u></b> Integridad de Membrana Promedio según el dilutor .....	52
y tiempo de conservación.	
<b><u>Cuadro Nro. 7:</u></b> Motilidad Promedio en semen de porcino según.....	55
raza y tiempo de conservación.	
<b><u>Cuadro Nro. 8:</u></b> Integridad de Membrana Promedio en semen de .....	57
porcino según raza y tiempo de conservación.	

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b><u>Gráfico Nro. 1:</u></b> Volumen Promedio de semen (ml) en las Razas.....48 Yorkshire y Landrace.
<b><u>Gráfico Nro. 2:</u></b> Concentración Promedio (espermatozoides x ml).....50 en las Razas Yorkshire y Landrace.
<b><u>Gráfico Nro. 3:</u></b> Motilidad Promedio de semen de porcino influenciado.....51 por el dilutor y tiempo de conservación.
<b><u>Gráfico Nro. 4:</u></b> Integridad de Membrana Promedio influenciado.....53 por el dilutor y tiempo de conservación
<b><u>Gráfico Nro. 5:</u></b> Motilidad Promedio en semen de porcino influenciado.....55 por raza y tiempo de conservación.
<b><u>Gráfico Nro. 6:</u></b> Integridad de Membrana Promedio en semen.....57 de porcino influenciado por raza y tiempo de conservación.

## ÍNDICE DE FOTO

<b>Foto 1:</b> Cabeza Gigante.....	16
<b>Foto 2:</b> Cabeza Pequeña.....	16
<b>Foto 3:</b> Cabeza Periforme.....	16
<b>Foto 4:</b> Cabeza Cónica y estrecha.....	16
<b>Foto 5:</b> Unión del cuello fuera del eje.....	17
<b>Foto 6:</b> Cuello doble.....	17
<b>Foto 7:</b> Cola corta.....	18
<b>Foto 8:</b> Cola múltiple.....	18
<b>Foto 9:</b> Pieza principal doblada.....	19
<b>Foto 10:</b> Gota citoplasmática proximal y distal.....	19

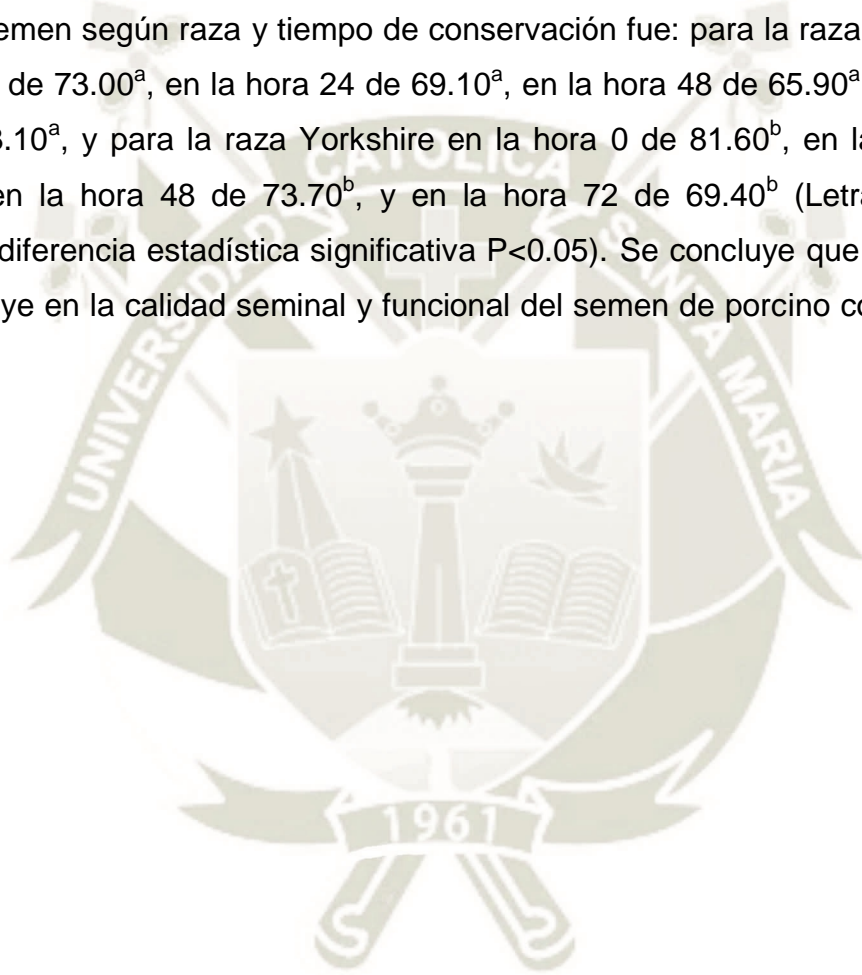
## ÍNDICE DE ANEXOS

Fichas de Laboratorio.....	68
Fotos.....	88
Foto 11: Motilidad Espermática .....	88
Foto 12: Concentración y Morfología en la Cámara de Burker.....	88
Foto 13: Integridad de Membrana.....	89
Foto 14: Laboratorio.....	89
Foto 15: Sustancia Hipoosmótica.....	90
Foto 16: Ficha para el análisis de Burker.....	90
Análisis Estadístico.....	91

## RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo con uso de reproductores machos porcinos en un centro de inseminación artificial, ubicado en la Ciudad de Arequipa, geográficamente ubicado entre las coordenadas latitud sur  $16^{\circ}23'57.41''$ , longitud oeste  $71^{\circ}32'12.79''$ . Con los objetivos de evaluar el efecto del dilutor, raza y tiempo de conservación sobre la calidad seminal y funcional del semen porcino conservado, se eligieron aleatoriamente dos razas de reproductores porcinos machos adultos (Yorkshire y Landrace), a los cuales se les evaluó la fracción rica del eyaculado de cinco colectas, con una frecuencia de recolección semanal. Los indicadores de calidad espermática evaluados fueron macroscópicos (volumen y color de eyaculado) y microscópicos (motilidad, concentración, morfología e integridad de membrana) cada uno con dos dilutores y esto a su vez en diferentes horas (0, 24, 48, 72 horas). En el análisis estadístico se aplicó un Análisis de varianza para un diseño completamente al azar con un arreglo factorial  $2 \times 2 \times 2$  (dos dilutores, cuatro tiempos de evaluación y dos razas evaluadas), para las características macroscópicas (volumen, color) y microscópicas (motilidad, integridad de membrana), se analizó con una prueba no paramétrica de Chi Cuadrado. Luego del periodo experimental se lograron los siguientes resultados: Volumen promedio (ml)  $140.00^a$  para Landrace y  $122.00^a$  para Yorkshire (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa  $P < 0.05$ ). Se observó que el 100% de las muestras presentaron el color blanco característico de semen. La concentración promedio (espermatozoides por ml) fue  $25.80^a$  para Landrace y  $23.20^a$  para la raza Yorkshire. Se observó que la motilidad promedio (%) de semen según el dilutor y tiempo de conservación fue: para el dilutor A en la hora 0 de  $77.30^a$ , en la hora 24 de  $73.90^a$ , en la hora 48 de  $70.70^a$ , y en la hora 72 de  $67.50^a$ , y para el Dilutor B en la hora 0 de  $77.30^a$ , en la hora 24 de  $72.80^a$ , en la hora 48 de  $68.90^a$ , y en la hora 72 de  $65.00^a$ . Integridad de membrana promedio (%) según el dilutor y tiempo de conservación fue: para el dilutor A en la hora 0 de  $92.4^a$ , en la hora 24 de  $85.9^a$ , en la hora 48 de  $71.6^a$ , y en la hora 72 de  $61.1^a$ , y para el dilutor B en la hora 0 de  $92.4^a$ , en la hora 24 de  $86.05^a$ , en la hora 48 de

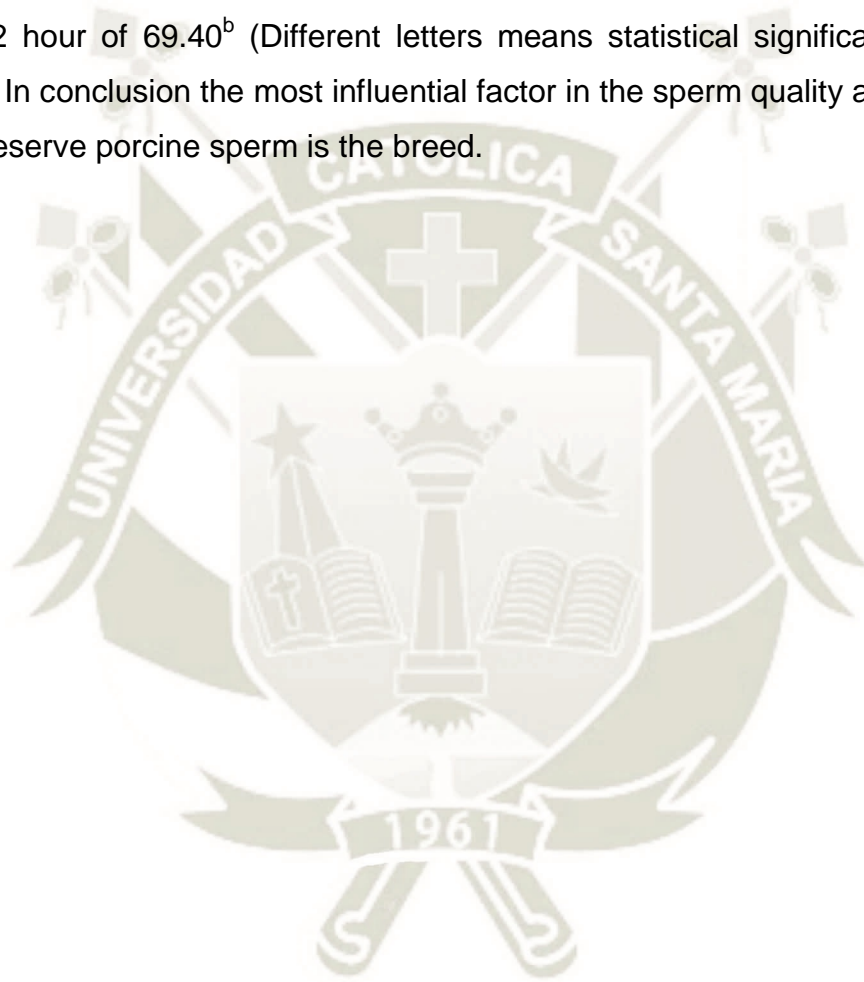
71.85<sup>a</sup>, y en la hora 72 de 61.95<sup>a</sup>. Se observó que la motilidad promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación fue: Para la raza Landrace en la hora 0 de 89.60<sup>a</sup>, en la hora 24 de 85.50<sup>a</sup>, en la hora 48 de 82.70<sup>a</sup>, y en la hora 72 de 79.90<sup>a</sup>, y para la raza Yorkshire en la hora 0 de 96.80<sup>b</sup>, en la hora 24 de 93.20<sup>b</sup>, en la hora 48 de 90.60<sup>b</sup>, y en la hora 72 de 88.20<sup>b</sup> (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa  $P < 0.05$ ). La Integridad de membrana promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación fue: para la raza Landrace en la hora 0 de 73.00<sup>a</sup>, en la hora 24 de 69.10<sup>a</sup>, en la hora 48 de 65.90<sup>a</sup>, y en la hora 72 de 63.10<sup>a</sup>, y para la raza Yorkshire en la hora 0 de 81.60<sup>b</sup>, en la hora 24 de 77.60<sup>b</sup>, en la hora 48 de 73.70<sup>b</sup>, y en la hora 72 de 69.40<sup>b</sup> (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa  $P < 0.05$ ). Se concluye que el factor que más influye en la calidad seminal y funcional del semen de porcino conservado es la raza.



## SUMMARY

This project was made with the use of males breeding porcine in an artificial insemination center, which is located in Arequipa City, geographically located between the coordinates south latitude  $16^{\circ}23'57.41''$ , west longitude  $71^{\circ}32'12.79''$ . With the objectives of calculate the diluter, breed and time of conservation effects on the seminal quality and functional of the preserve porcine sperm, was chosen randomly two breeds of males breeding porcine (Yorkshire and Landrace), evaluating the rich fraction of the semen in five collections, with a weekly frequency recollection. The signs of sperm quality evaluated were macroscopic (volume and sperm color) and microscopic (motility, concentration, morphology and membrane integrity) which one with two diluters and different hours (0, 24, 48, 72 hours). In the statistical analysis were applied a Variance analysis for a totally randomly design with a factorial arrangement  $2 \times 4 \times 2$  (two diluters, four times conservations and two breeds), the macroscopic characteristics (volume, color) and microscopic characteristics (motility, membrane integrity), were analyzed with a non parametric test of Chi- Square. Then of the experimental period were realized the next results: Average volume (ml)  $140.00^a$  for Landrace and  $122.00^a$  for Yorkshire (Different letters means statistical significant difference  $P < 0.05$ ). The 100% of the samples presented white characteristic sperm color. The average concentration (sperm for ml) was  $25.80^a$  for Landrace and  $23.20^a$  for Yorkshire. The average motility (%) of sperm according to diluter and time conservation was: for diluter A in the 0 hour of  $77.30^a$ , in the 24 hour of  $73.90^a$ , in the 48 hour of  $70.70^a$ , and in the 72 hour of  $67.50^a$ , and for diluter B in the 0 hour of  $77.30^a$ , in the 24 hour of  $72.80^a$ , in the 48 hour of  $68.90^a$ , and in the 72 hour of  $65.00^a$ . The average membrane integrity (%) according to diluter and time conservation was: for diluter A in the 0 hour of  $92.4^a$ , in the 24 hour of  $85.9^a$ , in the 48 hour of  $71.6^a$ , and in the 72 hour of  $61.1^a$ , and for the diluter B in the 0 hour of  $92.4^a$ , in the 24 hour of  $86.05^a$ , in the 48 of  $71.85^a$ , and in the 72 hour of  $61.95^a$ . The average motility (%) according to breed and time conservation was: for the Landrace breed in the 0 hour of  $89.60^a$ , in the 24 hour of  $85.50^a$ , in the 48 hour of  $82.70^a$ , and in the 72 hour of  $79.90^a$ , and for the Yorkshire

breed in the 0 hour of 96.80<sup>b</sup>, in the 24 hour of 93.20<sup>b</sup>, in the 48 hour of 90.60<sup>b</sup>, and in the 72 hour of 88.20<sup>b</sup> (Different letters means statistical significant difference  $P < 0.05$ ). The average membrane integrity (%) according to breed and time conservation was: for Landrace breed in the 0 hour of 73.00<sup>a</sup>, in the 24 hour of 69.10<sup>a</sup>, in the 48 hour of 65.90<sup>a</sup>, and in the 72 hour of 63.10<sup>a</sup>, and for the Yorkshire breed in the 0 hour of 81.60<sup>b</sup>, in the 24 hour of 77.60<sup>b</sup>, in the 48 hour of 73.70<sup>b</sup>, and in the 72 hour of 69.40<sup>b</sup> (Different letters means statistical significant difference  $P < 0.05$ ). In conclusion the most influential factor in the sperm quality and functional of the preserve porcine sperm is the breed.



## I. INTRODUCCION

### 1.1. Enunciado del Problema

Evaluación del Efecto del Dilutor, Raza y Tiempo de Conservación sobre la Calidad Seminal y Funcional del Semen Porcino Conservado. Arequipa 2012.

### 1.2. Descripción del Problema

El porcino doméstico (*Sus scrofa domesticus*, Linnaeus 1758), ocupa una posición importante en la economía global, especialmente en Europa y América (Honeyman et al. 2006), donde las cuatro razas más populares son Yorkshire, Landrace, Pietrain y Duroc, entre otras.

La inseminación artificial es uno de los factores más importantes subyacentes a la gran expansión de la porcicultura que se ha producido en los últimos años. Uno de los asuntos más investigados ha sido la conservación del semen, ya sea para ser utilizado para la inseminación artificial o para la fecundación in vitro (WHO 2000). La utilización masiva de la inseminación artificial en las granjas de cerdo es consecuencia del desarrollo de técnicas eficaces para conservar el semen de porcino durante un tiempo lo prolongado como para hacer esta técnica práctica desde el punto de vista económico.

Asimismo, la necesidad de mejorar la productividad de las especies, teniendo en cuenta que la calidad del semen puede variar de acuerdo con el tiempo de conservación, el dilutor y la raza del animal, en la presente investigación se implementó, además, un método de análisis más eficiente, como es la integridad de membrana, para observar la calidad del semen porcino.

### **1.3. Justificación del Trabajo**

#### **1.3.1. Aspecto general**

La conservación de gametos procedentes de animales de alto valor genético, requiere de una exhaustiva evaluación, tal es el caso de la presente investigación que pretende evaluar el efecto del dilutor, raza y tiempo de conservación sobre la calidad seminal y funcional del semen porcino conservado.

#### **1.3.2. Aspecto tecnológico**

Con la presente investigación se aportará nuevos conocimientos y herramientas para la evaluación de semen porcino conservado, lo cual representará una tecnología innovadora (investigación funcional) para ser utilizada por los profesionales especializados en porcinos y brindar un aporte tecnológico en el estudio de la calidad seminal.

#### **1.3.3. Aspecto social**

La conservación de gametos representa una alternativa para la preservación de material genético de animales de importancia para los propietarios y para mejorar la calidad de su producto; para ello el manejo del semen adecuado durante la colección, una adecuada conservación y la evaluación son un punto importante en el sistema productivo para los centros de producción y comercialización de semen conservado.

#### **1.3.4. Aspecto económico**

La buena conservación de semen porcino, es de gran importancia en la actualidad, ya que al tener un semen de buena calidad aumenta la reproductividad en las hembras, así mismo conservar la

funcionabilidad de los espermatozoides días después de su conservación. Lo que es de gran importancia para los productores, razón primordial del planteamiento de la presente investigación.

### **1.3.5. Importancia del trabajo**

La importancia de la investigación radicó en evaluar la calidad seminal y funcional del semen conservado de porcino, basándonos en la viabilidad de este en el cual se observó cómo es su viabilidad a las 24 horas después de su recolección y conservación, frente a marcadores de raza y dilutores.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivos generales**

Evaluar el efecto del dilutor, raza y tiempo de conservación sobre la calidad seminal y funcional del semen porcino conservado.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Valorar los parámetros macroscópicos de semen conservado de porcinos, sometidos a diferentes tiempos de conservación.
- Evaluar los parámetros microscópicos (motilidad, viabilidad, morfología y concentración espermática) en semen conservado de porcino.
- Determinar la funcionalidad de la membrana espermática de semen conservado de porcino, según el efecto del dilutor, raza y tiempo de conservación.

### 1.5. Planteamiento de la hipótesis

Dado que: La calidad del semen conservado está directamente relacionada con los parámetros macro, microscópicos y funcionales, es probable que: Se pueda evaluar la calidad del semen conservado porcino según el tiempo post conservación mediante volumen eyaculado, color del eyaculado, motilidad, concentración espermática, viabilidad espermática, morfología y prueba de funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide conservado de porcino.



## II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

### 2.1. Análisis bibliográfico

#### DESARROLLO Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA:

Según Hafez (1996), las espermátidas son células pequeñas (8mm de diámetro), derivan de una espermatogonia pálida del tipo A y están unidas por puentes citoplasmáticos. Se disponen en pequeños conglomerados de ubicación cercana a la luz del túbulo seminífero. Estas células presentan retículo endoplasmático rugoso abundante, mitocondria abundante y complejo de Golgi bien desarrollado.

Durante la transformación, se acumulan enzimas hidrolíticas, ordenan los organelos y los reducen en número, forman el flagelo y un citoesqueleto asociado, con reducción de citoplasma. Este proceso de espermiohidrogénesis se subdividió en cuatro fases: fase de Golgi, fase de capucha o cubierta, fase acrosómica y fase de maduración. La característica principal de este proceso se relaciona con la formación de un flagelo movible y un desprendimiento extensivo del citoplasma.

- 1) Fase de Golgi: las enzimas hidrolíticas formadas en el RER (retículo endoplasmático rugoso), se modifican en el aparato de Golgi y empaquetan en la cara trans de él, como pequeños gránulos proacrosómicos. La fase de Golgi comienza cuando las espermátidas avanzan hacia el espermatocito II. Se observan gránulos proacrosómicos que coalescen dentro de la vesícula acrosómica recubierta por membrana, formando un solo gránulo largo, el gránulo acrosómico, que rápidamente se dirige a la región perinuclear. La posición de la región acrosómica en el núcleo, identifica el polo anterior de la espermátida.

Paralelamente, los centriólos se alejan del núcleo y uno de ellos participa en la formación del axonema flagelar. Iniciada la generación de microtúbulos, los centriolos regresan a la posición perinuclear y participan en la formación de la pieza intermedia.

- 2) Fase de capucha o cubierta: Durante esta fase, la vesícula acrosómica aumenta de tamaño y su membrana rodea parcialmente al núcleo. Cuando esta vesícula alcanza su tamaño final, se identifica como acrosoma. Los centriolos se visualizan como proximal, en el polo posterior del núcleo y distal, en el corpúsculo del flagelo. Durante esta fase, el acrosoma que se desarrolla desde la vesícula acrosómica se extiende para cubrir parcialmente la cara anterior del núcleo. El acrosoma presenta una membrana acrosómica interna y otra externa encerrando el contenido acrosómico. Entre el ambiente interno y la membrana acrosómica interna, se forma un material filamentosos granular. Además, en la región del acrosoma, la carioteca nuclear pierde los poros nucleares y aparece denso, posiblemente por la condensación de la cromatina.
- 3) Fase acrosómica: Esta fase se caracteriza por la presencia de varias modificaciones en la morfología de la célula. El núcleo se condensa, la célula se alarga y las mitocondrias cambian su ubicación. Los cromosomas se condensan y conforme disminuye su tamaño, el núcleo se aplana y adquiere la forma característica. La característica principal de esta fase es la orientación del polo anterior del núcleo de la espermátida dirigido hacia la base de los túbulos seminíferos y la elongación y condensación nuclear. El citoplasma se desplaza hacia la región luminal del tubo seminífero. De esta manera, la región acrosómica se acerca rápidamente a la membrana plasmática y la célula se alarga. El núcleo aumenta de volumen y se alarga, mientras los gránulos de cromatina también se alargan y se vuelven uniformes en tamaño y dispersión,

finalmente el núcleo adquiere una apariencia homogénea, con una coloración oscura, desprovisto de estructuras internas. (Hafez y Hafez, 2002).

Cerca de los centriolos se forma una estructura con forma de anillo, que migra bajo el flagelo. Las mitocondrias se alinean en la región del cuello de la estructura. Esta porción del cuello se llama la pieza media. Cuando la migración mitocondrial cesa, el tubo caudal o machete desaparece. Distal a la pieza media se desarrolla una vaina fibrosa, las nueve fibras longitudinales.

- 4) Fase de maduración: se caracteriza por la pérdida de citoplasma por parte de la espermátida. Conforme se libera el exceso de citoplasma, se forman los espermatozoides individuales, que serán liberados desde las células de Sertoli. Las células de Sertoli fagocitan los residuos citoplasmáticos y los espermatozoides libres pasan hacia la luz del túbulo seminífero.

Los espermatozoides recién formados no tienen movilidad y no pueden fecundar al oocito. Sólo después de la maduración en el conducto epididimario adquieren movilidad progresiva.

### **ESPERMIACIÓN:**

Proceso fisiológico de liberación de los espermatozoides a la luz tubular, regulado por las células de Sertoli y bajo la influencia de la hormona LH, cuyo efecto sería el de facilitar el transporte de agua y sodio al espacio intracelular, fenómeno del cual dependen los cambios estructurales conducentes a la liberación.

## MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE:

Desde un punto de vista estructural, los espermatozoides están constituidos en tres segmentos principales, cabeza, cuello (pieza media) y cola. La cabeza está constituida por un núcleo oval el cual contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formada por ADN y una clase de proteínas especiales denominadas protaminas espermáticas (Hafez, 1996).

Pérez y Pérez (1985) mencionan que en esta parte del espermatozoide se halla una estructura denominada acrosoma, la cual es un revestimiento interno, el cual contiene sulfo – proteínas de cierta resistencia física. Hafez (1996) nombra que contiene las enzimas pro - acrosina, hialuronidasa y ácido hidrolasas, las cuales intervienen en el proceso de fecundación.

El cuello, está definido por la separación que queda entre los centriolos superiores e inferiores (proximal y distal respectivamente), entre el cuello y la cola propiamente dicha se llama pieza intercalar intermedia (Pérez y Pérez, 1985).

La cola, es el segmento caudal principal está integrado por una cobertura sulfoproteica, mientras que su interior contiene arginina, leucina y otros aminoácidos esenciales.

La célula espermática está cubierta por una membrana denominada plasmalema, la cual Strezezek (1997), indica que esta membrana es excepcionalmente sensible debido a su composición lipoproteica, lo que condiciona a esta célula a sufrir variaciones en su estructura molecular influenciada por el medio externo y estos efectos podrían deberse entre otros a procesos auto-oxidativos, alteraciones funcionales del sistema reproductor o técnicas invasivas sobre el eyaculado como es la inseminación artificial.

## **CALIDAD ESPERMÁTICA:**

La calidad espermática puede ser medida analizando la célula y los parámetros bioquímicos (Briz 1994; Knobil y Neil 1994; Sancho 2002).

En cuanto a los parámetros de la célula, se determina: la motilidad, concentración, morfología y aglutinación, como también la gota citoplasmática y la integridad de membrana.

### **Características Macroscópicas:**

- **Volumen**

Según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco el volumen oscila entre 50 a 125ml aproximadamente de fracción rica. Esta característica se puede medir con un recipiente graduado o se pesa en una balanza haciendo la conversión de 1gr equivalente a 1ml. (Espinoza 2002).

- **Aspecto o consistencia**

El eyaculado como tal, es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento, que contiene una suspensión de espermatozoides en un medio llamado plasma seminal. Chenowethlarg (2006).

- **Color**

Según Espinoza. (2002), señala que el color normal de un eyaculado es blanco variando la consistencia y la tonalidad del acuoso transparente a cremoso amarillento, según la concentración espermática que se tenga. Se pueden observar coloraciones atípicas como son: violáceas, rosáceas o de color beige, que pueden ser debidas a posibles infecciones o hemorragias internas del tracto reproductor del macho.

- **Olor**

El semen debe ser inodoro, cualquier olor representa una alteración.

- **pH**

Se utiliza una tira reactiva de pH o un potenciómetro. Los valores normales varían de 7.2 a 7.8. El pH es únicamente un indicador de la actividad metabólica de los espermatozoides, ya que al envejecer el eyaculado aumenta la concentración de ácido láctico y con esto un descenso del pH.

- **Temperatura**

Es importante registrar y controlar la temperatura del semen para evitar las variaciones durante todo su procesamiento para prevenir una disminución en la viabilidad de los espermatozoides. Es importante mantener el semen a una temperatura de 35 – 36°C para diluir.

#### **Características Microscópicas:**

- **Motilidad espermática**

Barth (2000) reseña que la motilidad masal es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Lo cual provoca movimientos de flujo y la existencia de verdaderas “olas” de zoospermios, que al estar disminuidos o en baja concentración provocan disminución.

**Cuadro Nro. 1**  
**Valoración de la Motilidad Espermática**

<b>Valor descriptivo</b>	<b>Aspecto de movimiento</b>	<b>% células móviles</b>	<b>Criterio evaluativo</b>
Valor de 0	Sin movimiento (necrospermia).	0 – 30 %	-
Valor de 1	Sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos.	30 – 40%	+
Valor de 2	Con movimientos anormales y algunos progresivos.	40 - 60%	++
Valor de 3	Con movimientos progresivos lentos y sinuosos.	60 – 80%	+++
Valor de 4	Con movimientos progresivos rápidos.	70 – 80%	++++
Valor de 5	Con movimientos progresivos muy rápidos.	80 – 90 %	++++

Fuente: Susana Espinoza - Manual de evaluación de la unidad de producción porcina 2002.

- **Concentración**

La concentración espermática se calcula de diversas formas, las más usuales son el espectrofotómetro, La Cámara de Burker y la Cámara de Neubauer.

El recuento en la cámara de Burker es el método más recomendado en pequeños centros de I.A., por su facilidad de cálculo y visualización a través del microscopio. El procedimiento es el siguiente:

- ✓ Se realiza una dilución de semen puro 1:100 en una solución de suero fisiológico formolado.
- ✓ Posteriormente se toma una gota con una pipeta Pasteur, la cual se deposita en el retículo de la cámara.
- ✓ El conteo se realiza en un microscopio a x400 aumentos y contando el número de espermatozoides que se encuentran dentro de 40 cuadraditos de la cámara.

La concentración de espermatozoides por  $\text{mm}^3$  es igual a la suma de espermatozoides contados  $\times 10000$ .

Para determinar la concentración usando la cámara de Neubauer, primero se realiza una dilución a 1:200 utilizando una pipeta de glóbulos rojos, dicha dilución se hace con un suero fisiológico formolado, después de la dilución se realiza el conteo en la cámara de Neubauer, únicamente se considera los espermatozoides presentes en 5 cuadrados grandes, los cuatro de las esquinas y uno del centro y los espermatozoides que tocan la línea superior e izquierda de un cuadrado se incluyen en la cuenta de ese cuadro.

El cálculo es el siguiente:

El número de espermatozoides obtenidos en ambas cuadrículas de la cámara, se dividen entre dos para obtener el promedio y el resultado se multiplica por 10 millones para obtener la concentración de espermatozoides/ml.

- **Morfología**

El equipo IVOS (sperm analyzer de Hamilton-Thorne) tiene un sistema Metrix Morphology, captura imágenes de espermatozoides previamente teñidos y a través de cálculos de imagen puede determinar las anomalías espermáticas. Es un sistema que tiene un software que

tiene que ser codificado para cada especie animal con los estándares de normalidad y anormalidades espermáticas. El Metrix permite obtener mediciones de la cabeza, del espermatozoide del largo mayor y menor, elongación, perímetro y largo del acrosoma. También permite detectar anormalidades en la cola del espermatozoide y gota citoplasmática.

### **Espermatozoides morfológicamente anormales**

Las malformaciones espermáticas de acuerdo a su origen se dividen en dos grupos:

- ✓ Anormalidades primarias.
- ✓ Anormalidades secundarias.

Las anormalidades primarias, ocurren a nivel de testículo durante el proceso de la espermatogénesis y la espermiogénesis.

Las anormalidades secundarias se presentan durante el proceso de maduración a nivel de epidídimo.

Un aumento en la cantidad de ambos tipos de anormalidades en los espermatozoides de más de 15% trae como consecuencia una disminución de la fertilidad de hasta 12% y también un lechón menos en el parto (Espinoza., 2002).

- **Anormalidades primarias**

a) Anormalidades de cabeza:

- Cabezas gigantes
- Cabezas pequeñas
- Cabezas periformes
- Cabezas cónicas y estrechas

- Anormales desprendidas
- Formas teratoides
- Defectos de acrosoma
- Vacuolas nucleares (defecto cráter/diadema)
- Condensación anormal del DNA

**Foto 1: Cabeza Gigante**



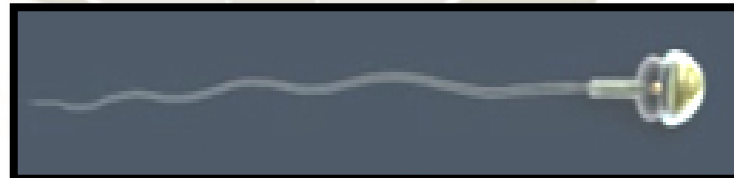
Fuente: Google

**Foto 2: Cabeza Pequeña**



Fuente: Google

**Foto 3: Cabeza Periforme**



Fuente: Google

**Foto 4: Cabeza Cónica y estrecha**

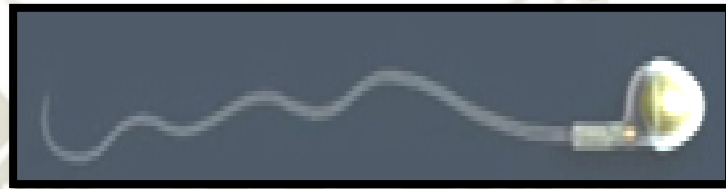


Fuente: Google

b) Anormalidades de cuello

- Unión del cuello fuera del eje (descentrado)
- Cuello doble
- Cuello en espiral
- Cuello deshilachado, granular o hinchado

**Foto 5: Unión del cuello fuera del eje**



Fuente: Google

**Foto 6: Cuello doble**

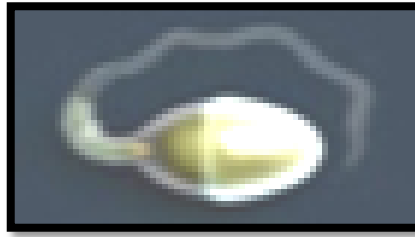


Fuente: Google

c) Anormalidades de la cola

- Cola corta (defecto de la cola en muñón)
- Colas abaxiales, accesorias o múltiples
- Pieza media doblada, hinchada, abaxial, incompleta
- Aplasia segmentaria de la pieza media y defectos de la vaina mitocondrial
- Gota citoplasmática proximal
- Defecto Dag

**Foto 7: Cola Corta**



Fuente: Google

**Foto 8: Colas múltiples**



Fuente: Google

- **Anormalidades secundarias**

- a) Anormalidades de la cabeza

- Cabezas normales desprendidas
- Acrosoma roto, deforme o desprendido

- b) Anormalidades de la cola

- Pieza media distal doblada
- Pieza principal doblada
- Pieza principal doblada por shock hipotónico
- Gota citoplasmática proximal y distal

**Foto 9: Pieza principal doblada**



Fuente: Google

**Foto 10: Gota Citoplasmática Proximal y Distal**



Fuente: Google

c) Otras células

- Células epiteliales
- Eritrocitos
- Formaciones de medusa
- Células precursoras de esperma
- Células redondas
- Glóbulos blancos

Las anomalías podrían considerarse como una herramienta de diagnóstico de fallas reproductivas en los machos si se identifica acertadamente su causa.

A continuación se describe algunas anomalías, sus posibles causas y en algunos los porcentajes permitidos:

- Anormalidades en tamaño y forma de la cabeza: Son el resultado de una alteración en el proceso de condensación de la cromatina y/o desarrollo de acrosoma. Porcentaje máximo permitido 7%.
- Presencia de cabezas sueltas: Se asocia a una degeneración testicular. Este defecto se desarrolla en los primeros estadios de la espermiogénesis, pero se manifiesta frecuentemente a nivel de epidídimo, cuando los espermatozoides adquieren su capacidad de movimiento. Porcentaje máximo permitido 8%.
- Colas en látigo: Se presentan por choque térmico, osmótico y/o pH durante el manejo del semen, contacto con sustancias spermicidas, machos estresados por calor, machos con procesos febriles. Porcentaje máximo permitido 20%.
- Gotas citoplasmáticas: Macho sexualmente inmaduro, sobreutilizado, estrés térmico, traumatismos a nivel del epidídimo. Porcentaje máximo permitido de gotas citoplasmáticas proximales 10% y de distales 15%.
- Colas enrolladas: Respuesta a condiciones extremas del ambiente como variaciones drásticas de temperatura, de pH, de presión osmótica, presencia de compuestos tóxicos, rayos UV y contaminación bacteriana. Porcentaje máximo permitido 7%.
- Alteraciones a nivel del cuerpo medio del espermatozoide: Porcentaje máximo permitido 5%.

Un estrés térmico en los sementales aumenta la secreción de cortisol y disminuye los valores séricos de testosterona. Esto se ve reflejado en una alteración de la producción espermática: aumenta el porcentaje de anormalidades espermáticas como la gota citoplasmática proximal,

defectos en la pieza intermedia, defectos de cola, cabezas anormales, defectos de acrosoma, así mismo el porcentaje de motilidad disminuye igual que el volumen del eyaculado.

Los efectos adversos de un estrés calórico aparecen generalmente a los siete a 14 días después del inicio del incremento térmico. La recuperación de la calidad espermática se puede presentar a las 5 a 8 semanas después del periodo de estrés de este tipo.

La evaluación de la morfología se realiza por medio de un frotis teñido, con el fin de observar las anomalías morfológicas de los espermatozoides; existen diversas tinciones para este objetivo por ejemplo el Tripán Azul y Eosina – Nigrosina.

### **Niveles de tolerancia de espermatozoides anormales**

Según las normas ISO 9002 de calidad para centros de inseminación artificial a nivel mundial establecida por el Departamento de Medicina del Rodeo y la Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá, reportado por Barth (2000), se contempló como exigencia mínima, respecto a los parámetros seminales, un rango máximo de normalidades toleradas: cabezas 15-20%, acrosoma y cola hasta un 25% y un mínimo de 70% de espermatozoide normales.

### **Células vivas o muertas**

Para contar espermatozoides vivos o muertos se puede utilizar diferentes medios de coloración: Tripán azul (espermatozoide vivo se observa blanco y el muerto azul), Eosina – Nigrosina (el espermatozoide vivo se observa blanco y el muerto rojizo).

## Estado del acrosoma

El acrosoma es una estructura del espermatozoide situado en la parte craneal y que juega un papel crucial en la fecundación. Los espermatozoides deben pasar por una etapa de cambios en el tracto genital de la hembra, para ser capaces de fertilizar. Este proceso se llama capacitación (modificaciones en la membrana espermática). La capacitación es seguida por la reacción del acrosoma, sin la cual no sería posible la penetración del óvulo.

La reacción consiste en lo siguiente:

La membrana plasmática del espermatozoide en la región de la cabeza, donde se encuentra el acrosoma, se une en diferentes puntos con la membrana exterior del acrosoma. La fusión ocasiona la formación de aberturas que permiten la salida del contenido del acrosoma, que consiste principalmente de enzimas. Estas enzimas permiten disolver la estructura gelatinosa y el cúmulus de tal manera que el espermatozoide encuentre su fácil camino a la superficie de la zona pelúcida y ocurra así la fecundación.

Con lo explicado anteriormente se ve la importancia que tiene el estudio del acrosoma, pero el análisis es limitado a laboratorios que tengan microscopio con contraste de fases.

Las tinciones especiales para acrosoma como la de Kovacs y Foote (K-F) que es a base de azul triptano y Giemsa. Con esta tinción se permite observar 10 diferentes estados de los espermatozoides, dentro de los cuales se indicará si el acrosoma se encuentra intacto, dañado o se ha perdido (Barth 2003):

- Vivo con acrosoma intacto.
- Vivo con acrosoma libre.

- Vivo con daño acrosomal.
- Vivo sin acrosoma.
- Vivo sin acrosoma y anillo postacrosomal.
- Muerto con acrosoma intacto.
- Muerto con acrosoma libre.
- Muerto con daño acrosomal.
- Muerto sin acrosoma.
- Muerto sin acrosoma y anillo postacrosomal.

### **Métodos:**

#### **1. Viabilidad espermática, acrosoma y la integridad mitocondrial:**

La viabilidad espermática es un parámetro muy importante cuando se evalúa la calidad del eyaculado y básicamente describe el porcentaje de espermatozoides viables y no viables.

- Núcleo:

Para evaluar la viabilidad espermática, muchos métodos pueden ser utilizados. Por un lado tenemos las coloraciones que se observan por el microscopio óptico utilizando eosina azul- anilina o eosina-nigrosina (Sancho 2002). La base de este método la membrana del plasma es no permeable a las coloraciones, pero cuando el espermatozoide es no viable esta membrana es permeable.

Estos métodos convencionales, han probado no ser suficientemente buenos y ahora se utiliza lo que es la fluorescencia. Esta nos permite no solo observar el núcleo sino también el acrosoma (Gravance et al 2000). El método consiste en utilizar las propiedades del Acridin naranja de excitación entre unos 450 a 490 nm. Este fluorescente emite una fluorescencia

verde si el ADN no está alterado, lo que significa que el espermatozoide es viable, o una fluorescencia roja si este no es viable. (Zinie et al 2000). De forma interesante el color rojo de la fluorescencia está relacionado con la infertilidad del macho en la estructura acromática (Silva y Gadella 2006).

- Acrosoma:

Las moléculas para el análisis consisten en las lectinas, una familia de glucoproteínas que se encargan de reconocer y captar los carbohidratos a las membranas del plasma, conjugado con fluorocromo.

Estas lectinas reconocen la enzima proacrosina/acrosina y el espermatozoide se presenta menos coloreado si el acrosoma está intacto, pero una coloración elevada se observa cuando el acrosoma no está intacto (Osaki et al. 2002).

Proacrosina es la forma inactiva de la acrosina y se convierte en la activa durante la reacción del acrosoma. (Howes y Jones, 2002). La acrosina es una serie de proteasa que está presente en el acrosoma y juega un papel importante en la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida.

- Viabilidad espermática en condiciones estándares:

Como porcentajes de viabilidad bajo estándares normales, los porcinos eyaculan entre un 65% y 85% de espermatozoides viables (Pinat et al, 1999). Cuando el porcentaje de espermatozoides viables es menor del 65% se refiere a una necroespermia o necrozoespermia.

## 2. Motilidad espermática:

Naturalmente los espermatozoides tienen la habilidad de moverse por medio de ondulaciones que producen su cola. La motilidad espermática es una de las más frecuentes en ser analizadas y utilizadas como parámetros en los centros de producción de semen de calidad espermática del eyaculado (Sancho 2002).

De todas formas existe una relación entre la motilidad espermática y fertilidad espermática.

El análisis de motilidad espermática consiste en determinar el porcentaje de motilidad y no motilidad de los espermatozoides y el movimiento en conjunto. (WHO 2000). Este proceso de determinación puede ser presentado en ambos de forma objetiva y subjetiva.

En estos años, los sistemas de computadoras para determinar los parámetros del espermiograma se han incrementado. Computer-Assisted Semen Analysis (CASA), provee con más precisión y objetividad los parámetros de motilidad de los espermatozoides, reduciendo los errores de los análisis (Kvist y Bjorndahl 2002).

## 3. Morfología espermática:

La evaluación de las características morfológicas del espermatozoide juega un papel importante en el análisis del semen, especialmente para el estudio de las anomalías del espermatozoide. Por diferentes investigaciones, la morfología del espermatozoide es un parámetro que se utiliza para ver la fertilidad (Alm et al.. 2006).

La examinación al microscopio nos permite observar el porcentaje de madurez, inmadurez y las anomalías del espermatozoide. La

madurez del espermatozoide debe ser del 75 al 80% como una medida estándar (Kvist y Bjorndahl 2002).

Cuando el porcentaje de inmadurez es mayor al 30%, se observa una disfunción del epidídimo, donde no se realizó la madurez del espermatozoide a lo largo del epidídimo. Esta falta de madurez generalmente se produce por una serie de eyaculaciones rápidas (Pruneda et al 2005).

Las anomalías de los espermatozoides pueden afectar la cabeza y/o la cola. Dependiendo del origen, las malformaciones pueden ser primarias, cuando se producen en el testículo durante la espermatogénesis, o pueden ser secundarias, cuando ocurre en el epidídimo (Boner et al 1995).

Las malformaciones de la cabeza pueden ser en forma de número (dos a más cabezas), en la forma (triangular, ovoide), o en el tamaño (micro o macro cefálico). Las malformaciones de la cola pueden ser en forma de números (dos o tres colas) y en la trayectoria (cola pequeña).

En estos años sistema computarizado, también es utilizado para el estudio de la morfología del espermatozoide, nos permite observar el área del espermatozoide, el perímetro del espermatozoide, la medida y el peso de la cabeza del espermatozoide. Usando este método y el grado de intensidad de la fragmentación de la cromatina, se ha demostrado que la morfología del espermatozoide no está relacionada a las desviaciones de la estructura de la cromatina.

Cuando los porcentajes de anomalías espermáticas son mayores al 50% se llama terastospermia o teratozoospermia (WHO 2000).

## **Factores que afectan la calidad seminal**

Barth (2000), cita que un proceso de evaluación la calidad seminal puede verse afectada por procesos directos, que evidencian alteraciones en la espermatogénesis o por defectos del manejo del semen.

Además Spitzar (2000) coincide en opinar que las causas que podrían producir una espermatogénesis anormal, pueden ser clasificadas como relacionadas con elevadas temperaturas, el estrés o con la edad, otras causas menos comunes podrían ser clasificadas como genéticas, tóxicas o tal vez deficiencias en la nutrición.

### **3.1.1. La temperatura**

Es uno de los factores ambientales más importantes que modifican la espermatogénesis. Echeverri (2003) cita que la temperatura corporal puede verse afectada por periodos de temperatura ambiental alta al igual que extremadamente bajas o por cuadros de pirexia ocasionado por enfermedades y/o heridas.

Spitzar (2000) argumenta que el mecanismo de daño por temperatura, es la hipoxia testicular, esto se debe a que los testículos operan normalmente en un punto muy cercano a la hipoxia y al ser activados los mecanismos de pérdida de calor, hay vaso dilatación y aumento de la actividad metabólica con una necesidad directa de incrementar el oxígeno, este incremento de oxígeno es una tasa mayor que la del flujo sanguíneo por tanto los testículos se tornan hipoxicos.

Además, según cita de Parks (2003) el calentamiento de los testículos provoca que los espermatocitos en la fase meiotica sean destruidos y se den alteraciones en las transformaciones de espermatátidas a espermatozoides, principalmente cambios en la condensación de la

cromatina nuclear, formación de la cola y desarrollo del casquete acrosómico de los espermatozoides. Al igual se ve afectado el epidídimo y sus funciones normales absorbentes y secretoras que ocasionan cambios en la composición de los fluidos, e incrementan la tasa de paso espermático que conlleva a una prematura maduración espermática.

Mediante un seguimiento riguroso en varios trabajos Kastelic (2002) evaluó lo expresado por autores como Salisbury (1974) Y Hafez (1989), y logró establecer que para que se produzcan espermatozoides fértiles, se deben contar con una temperatura testicular de 2 a 6 grados centígrados menor que la temperatura corporal central y presentar en promedio temperatura de 35.5, 34.6, 33.1 grados centígrados respectivamente en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo.

Las altas Temperaturas provocan una disminución en la liberación de la LH. Weison y Jonson (1981). Evidenciaron que al verse disminuida la producción la LH, provocado por altas temperaturas, consecuentemente se da bajos niveles de testosterona disponible para las células germinales en crecimiento, la secreción de las células de Sertoli y para el normal funcionamiento del epidídimo, lo cual es agravado aun más por la hipoxia testicular.

### **3.1.2. El estrés**

Aún cuando se tienen diferentes interpretaciones de estrés Echeverri (2003) lo define como aquel estado generado por toda situación interna o externa que perturbe el equilibrio físico y aún social del animal, creando tensión y tendiendo a colocar los mecanismos de defensas del mismo en un estado de alerta y actividad que le permitan responder ante situaciones adversas.

El organismo responde, según cita Berdugo (1994) mediante la producción excesiva de cortisol por parte de las glándulas adrenales lo cual reduce la producción de LH. por la pituitaria. Lo que conduce a una disminución en la producción de testosterona por las células de Leydig,

Barth (2000) Reporta, que el estrés prolongado provoca cuadros de degeneración testicular, que pueden variar de ligera hasta aplasia completa del epitelio seminífero, según la intensidad y el tiempo de acción del estímulo. Además, según cita de Spitzar (2000), se provoca un aumento de espermatozoides con anormalidades de cabeza, periforme, alongadas y estrechas. En casos severos podría provocar una azoospermia.

### **3.1.3. Los factores nutricionales**

La nutrición, tiene mayor impacto sobre las funciones endocrinas más que las espermatogénicas. Así lo reporta Chacón (2002). Debido a que el estrés nutricional provoca retardo en el crecimiento de los testículos y supresión de la actividad endocrina lo que conduce a tener un mayor impacto en animales jóvenes en crecimiento ya que retarda la pubertad y deprime la producción y características del semen.

Barth (2000) cita, que los factores nutricionales más comunes que afectan la calidad seminal incluyen la obesidad y sobrealimentación, las diferencias calóricas (raciones bajas en energía disminuyen el libido y la producción de testosterona), proteínicas (especialmente en machos jóvenes), vitaminas y de minerales (deficiencias de yodo, cobre, cobalto, zinc y magnesio) afectan la producción de semen y la fertilidad, igualmente es causa de baja de libido y agentes tóxicos (los estrógenos vegetales, además las tierras raras y radiaciones ionizantes).

Las dietas ricas en energía según Coe (1999) permiten a animales jóvenes de 12 meses una circunferencia escrotal mayor, pero por el contrario en animales mayores se ve transformado en grasa lo que conlleva a una mala termorregulación de los testículos. Además de anomalías de aplomos y conformación que conducen a Laminitis y posibles epifitis. De igual forma según Larson (1997) las dietas ricas en energía, constituyen una de las causales de ruminitis y abscesos de hígado que conducen a vesiculitis y epididimitis.

#### **3.1.4. Efecto de La edad**

La producción de espermatozoides está asociada en forma directa con la pubertad. Berdugo (1994), sostiene que la edad de pubertad depende de variaciones propias que hay entre las razas de leche y carne. Así se explica en general que las razas de tamaño adulto grande con altas ganancias de peso que las razas de tamaño adulto menor que poseen menores ganancias. Y que las razas históricamente seleccionadas por su producción de leche, tiene un comienzo de la pubertad más temprano y un mayor desarrollo testicular a menor edad y madurez que las razas que producen poca cantidad de leche. Además, para el caso de razas de doble músculo poseen un comienzo de la pubertad más lento y poseen un tamaño testicular más pequeño a la pubertad y a la madurez.

#### **3.1.5. Genes recesivos**

Cardellino (1999) cita que las razas porcinas al igual que cualquier especie tienen caracteres deseables e indeseables y en sus cromosomas hay genes recesivos indeseables, algunos letales ó altamente deletéreos que se encuentran en forma heterocigótica y que tienen mayor oportunidad de manifestarse en los casos de consanguinidad.

### 3.1.6. Alteraciones técnicas ó defectos del manejo de semen

Según Paparella (2001) Una muestra de semen refleja la capacidad de fecundación y las condiciones generales de salud y del aparato reproductor. Y a su vez sirve de elemento de juicio para dar aceptación o descarte de un porcino para servicio, e incluso su destino para sacrificio. Esto implica lo que significa que:

Evaluar la calidad de un semen, según Echeverry (2003) se debe tener muy claro las condiciones de manipulación y los posibles defectos en lo que se puede incurrir y que generan errores al momento de emitir un concepto que juzgue la calidad seminal.

Las alteraciones técnicas, según cita Barth (2000) generalmente son de orden involuntario o por desconocimiento de los posibles efectos al momento de manipular la muestra y /o evacuarla. Las alteraciones pueden deberse a shock hipotónico por exposición al frío, por la función, por contaminación con orina. Lo cual genera cambios bruscos, que ocasionan daños en la membrana mitocondrial lo que conlleva a efectuar la movilidad principalmente por Flexión de cola.

La muestra a evaluar puede verse afectada, según Barth (2003) por contaminación de agua, con venenos (garrapaticidas, mata malezas, etc.), por estiércol e instalaciones descuidadas y pozos sépticos. A su vez también por largos intervalos de tiempo entre la toma de la muestra seminal y la evaluación de la misma.

Igualmente Castellanos (1986), reseña que factores mecánicos como la mala estimulación del toro o fallas en el equipo de electro eyaculación, conducen a una baja concentración de espermatozoides y/o a zoospermia en el eyaculado. Esta baja concentración constituye una alteración para medir la motilidad masal.

### 3.1.7. Malformaciones congénitas

La producción y fertilidad de los espermatozoides, se ve afectada por malformaciones congénitas que van, según Hafez (1989), desde la ausencia del epitelio seminífero y segmentos de los conductos de Wolff hasta el criptorquidio y testículos ectópicos, entre otros.

Igualmente Barth (2000), reseña que hay malformaciones congénitas que conllevan a inhabilidades copulativas, como es el caso de la espondilosis lumbar, garrones débiles, músculo retractor del pene corto o pene corto, frenulos peneanos, desviación espiral del pene, etc.

#### 4. Aglutinación espermática:

Aglutinación espermática es cuando un espermatozoide amarra a otro cabeza con cabeza o cola con cola. Se sabe que los cationes bivalentes y trivalentes en el plasma seminal induce a la aglutinación espermática (Yeste et al 2007).

#### Posibles causas de la aglutinación:

- Presencia de restos de gel procedente de las glándulas bulbouretrales: filtrado ineficaz, tapioca muy fluida.
- Concentración muy elevada del eyaculado.
- Mala calidad espermática: Espermatozoides muertos o con baja vitalidad.
- Shock térmico por manipulación inadecuada del semen.
- Contaminación bacteriana del eyaculado. Se ha estudiado que bacterias resistentes a la gentamicina pueden provocar aglutinación en el semen.
- Presencia de gran cantidad de células epiteliales, descamaciones.

- Cambios en el pH del plasma seminal, por problemas en las glándulas accesorias del verraco (procesos inflamatorios)
- Cambios en presión osmótica o pH del diluyente de semen debido a una incorrecta preparación de éste.
- Presencia de contaminantes externos de distintos orígenes: talco de los guantes, agua destilada de mala calidad, presencia de restos de jabón, etc.
- Por efecto de la elevación térmica corporal durante procesos febriles (debido a distintas patologías o por reacciones vacunales). También como consecuencia de temperaturas ambientales excesivas.
- Puede producirse en semen heterospérmico por incompatibilidad entre eyaculados.
- De origen inmunológico, debido a la presencia de anticuerpos específicos formados contra los componentes de la membrana espermática.

#### **Métodos para reducir la aglutinación:**

- Temperatura: Mantenimiento de la temperatura del eyaculado. Recogida con termo atemperado a 37-38°C. Realizar la dilución completa lo antes posible. Evitar cambios de temperatura durante el procesado de semen y durante la conservación de las dosis.
- Aumentar el filtrado del eyaculado durante la recogida utilizando doble gasa estéril.
- Realizar la recogida de semen sobre 100 cc de diluyente atemperado.
- Es fundamental el uso de diluyente de alta calidad. Evita cambios en el pH gracias a la presencia de buffers específicos en su composición, manteniendo la osmolaridad constante a lo largo de la conservación del semen.

- Evitar la contaminación bacteriana del semen durante la recogida del eyaculado y a lo largo de todo el procesamiento del semen.
- Evitar los contaminantes externos (sustancias espermicidas) en el semen: orina, agua, desinfectantes, jabones, etc. Usar guantes de látex o vinilo sin talco. De todas maneras, previamente a la recogida de semen, es conveniente lavar las manos enguantadas para eliminar posibles residuos de talco y polvo, y secar.
- Cuidar al máximo el estado general de los verracos: condiciones ambientales, sanitarias y de manejo adecuadas.
- Tratamientos con vitamina C, previene la aglutinación espermática mediante la activación de la antiaglutinina.

### **LA RAZA COMO DETERMINANTE DE CIERTAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES:**

En estudios que se han realizado se determinó que la raza Yorkshire tiene mayor calidad seminal que otras razas de porcinos, esto se debe a que esta raza presenta una madurez sexual más temprana que las demás razas, es así también que al momento de la conservación del semen, este puede tener mayor viabilidad que el semen de otras razas. (Swierstra, 1973).

### **PRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES:**

La supervivencia de los espermatozoides eyaculados en el plasma seminal sólo se limita a unas pocas horas. Para mantener los espermatozoides por periodos más prolongados y para enfriar o criopreservar semen es necesaria la dilución con una solución protectora.

Se han empleado como diluyentes o expansores de semen distintas soluciones. La mayor parte de las cuales son variaciones de unas pocas fórmulas principales.

Para preservación de espermatozoides de mamíferos se usan dilutores que contiene varios componentes, en el procedimiento de preparación de estos, se emplean sustancias puras a fin de excluir materiales tóxicos al ambiente espermático. Los componentes usuales de estos, son principalmente carbohidratos simples como la glucosa, la cual es la fuente de energía para el espermatozoide, también se usa yema de huevo así como la leche para la protección de los espermatozoides durante el choque térmico, cuando son enfriadas desde la temperatura corporal hasta 5°C. Dichas sustancias también contienen nutrientes usados por los espermatozoides. Se usan diversos amortiguadores para mantener un pH cercano al neutro y una presión osmótica aproximada de 300 mOsn, equivalente a la del semen, plasma sanguíneo y leche. Para la inhibición del crecimiento microbiano se usa penicilina, estreptomina, polimixina B u otras combinaciones de antibióticos de amplio espectro bacteriano.

La obtención de semen supone cierto estrés para la célula espermática, del mismo modo la preservación en un medio artificial, ocasiona una disminución de la cantidad y calidad de espermatozoides, la adición de sustancias que mantenga la integridad de estas células; una de estas sustancias son los antioxidantes que proveen un efecto beneficioso sobre la viabilidad de los espermatozoides a través de la supresión de la peroxidación lipídica de la adición de antioxidante en la dilución de espermatozoides mamíferos, bloquean la producción de especies de oxígeno reactivo y/o contrarrestan la toxicidad del oxígeno, mejorando con éxito la fertilidad (Alvarez y Stoney 1983; Maxwell y Stojanov, 1996).

#### **DILUYENTES QUE SE PUEDEN UTILIZAR:**

- **Diluyente de larga duración (7 días):**

Acción: Diluyente de semen de verraco de larga concentración.

- Estimula y mejora el transporte espermático y la anidación embrionaria.
- Controla la contaminación bacteriana presente en el eyaculado.
- Permite la rápida estabilización del pH del semen diluido.
- Reduce la degradación espermática cuando existen niveles altos de morfo anomalías.
- Controla problemas de aglutinación espermática.

Indicaciones:

Conservación del semen diluido entre 6 y 10 días según la cantidad del semen usado. Permite mejorar la fertilidad y prolificidad durante los primeros días de conservación con respecto a los diluyentes comunes.

## 2.2. Antecedentes de investigación

### 2.2.1. Revisiones de tesis universitarias

#### **Evaluación de Dos Dilutores sobre los Parámetros Macro, Microscópicos y Funcionales de Semen Conservado de Caninos. Arequipa – 2011.**

Se observó el diseño de un estudio experimental para realizar la evaluación de dos dilutores sobre los parámetros macro, microscópicos y funcionales del semen conservado de caninos. Para tal efecto se utilizaron 5 caninos adultos sin raza definida, intradomiciliarios, clínicamente sanos y de fertilidad comprobada. De estos animales se obtuvieron 4 muestras seminales las cuales se dividieron 2 alicuotas de 0.5ml, las mismas que fueron sometidas a dos dilutores, el primero basado en Leche UHT (LUHT) y el segundo basado en Glucosa Citrato (GC), y a 4 horas de evaluación (0, 24, 36 y 48 horas), asimismo, en estas se evaluaron Volumen (ml), Color (blanco lechoso, blanco opalescente), Motilidad (%), Viabilidad (%),

Morfología (% de cada categoría), Concentración (espermatozoides por ml), Integridad de membrana (%). Luego del análisis se halló un promedio final del volumen de semen de  $1.88 \pm 0.30$  ml, correspondiente a la segunda fracción, Con relación al color del semen, el color predominante fue de Blanco lechoso, a excepción de un espécimen que mostró dos muestras de color Blanco Opalescente, en referencia a la concentración de espermatozoides al inicio del estudio, se encontró un valor de  $470,48 \pm 47.93 \times 10^6$  células espermáticas, el cual fue considerado normal. Con relación a la motilidad se observó un valor inicial de 95.7%, pero luego de someter las muestras a las horas de evaluación (24, 36 y 48 horas), se apreció una diferencia estadística significativa entre ellas ( $P < 0.05$ ). El efecto de la adición de los dos dilutores entre las horas evaluadas ( $P < 0.05$ ). El efecto de la adición de los dilutores sobre el semen canino afectó significativamente ( $P < 0.05$ ) la viabilidad de los espermatozoides en el tiempo, mostrando valores iniciales similares en ambos dilutores (88.65%) y este valor disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores de 62,30% en el caso del dilutor en base a Leche UHT y 63% para el dilutor Glucosa Citrato, asimismo, no se halló efecto del dilutor entre las horas evaluadas ( $P < 0.05$ ). Con relación a las anomalías morfológicas, el porcentaje promedio de espermatozoides normales fue de 80%, las anormalidades halladas corresponden a la pieza intermedia, donde se han encontrado un porcentaje de 15.7% de gotas citoplasmáticas proximales y 4,35% de gotas citoplasmáticas distales. En relación a la integridad de membrana, no se hallaron efectos de los dilutores; sin embargo, durante las horas de evaluación se observa una disminución lineal en el tiempo, estos valores difirieron significativamente ( $P < 0.05$ ), lo cual permite establecer que conforme pasa el tiempo, la integridad de membrana se altera significativamente. EL efecto de ambos dilutores sobre los parámetros evaluados fue similar en todos los parámetros

evaluados, lo que permitiría utilizar en forma práctica el dilutor basado en Leche UHT, con las mismas ventajas que el dilutor Glucosa Citrato.

### 2.2.2. Otros trabajos de investigación

#### **New Insights into Boar Sperm function and Survival from Integrated Field and Laboratory Studies. Universidad de Girona – España.**

La adición de diferentes sustancias al semen ha sido descrita como un método para mejorar la calidad seminal entre 15 – 17°C o cryoconservación. Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  es una hormona que ha sido utilizada para mejorar la reproductividad en porcinos. El presente estudio muestra que la adición de PF<sub>2</sub> $\alpha$  para extender el semen a 2.5, 5 y 10mg/100ml, no daña al espermatozoide a una temperatura de 15°C, cuando la viabilidad espermática, la integridad de la membrana mitocondrial y del acrosoma, la motilidad espermática, la morfología, la aglutinación y la resistencia osmótica son evaluados. De todas formas, la adición de PF<sub>2</sub> $\alpha$  a 5mg/100ml parece mantener la viabilidad espermática mejor que los suplementos de conservación. Aparte de los efectos de PF<sub>2</sub> $\alpha$ , han sido observados en el presente estudio que el ácido hyalurónico retrasa la capacitación del semen porcino en temperaturas bajas, sin afectar los otros parámetros funcionales. La tolerancia de los espermatozoides a estos cambios han sido utilizados como parámetros para evaluar la función espermática, correlacionada con la fertilidad y la prolificidad, evaluando que no hay retorno a los 60 días de la primera inseminación.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Localización del trabajo

###### a. Localización espacial

La presente investigación se desarrolló en una granja que se encuentra ubicada en la zona de Rio Seco, Provincia y Departamento de Arequipa. Geográficamente ubicado:

A una altitud de 2332 m.s.n.m. entre las coordenadas latitud sur 16°23'57.41", Longitud oeste 71°32'12.79".

Con una temperatura promedio de 15.8 °C con una variabilidad de 8.2°C a 25.6°C, con una humedad relativa mayor a 27% y menor a 70% y una precipitación promedio de 78mm (Google Earth, 2011).

###### b. Localización temporal

El desarrollo de la investigación de campo colección y evaluación seminal se desarrolló en las instalaciones del laboratorio especializado en semen de porcinos, entre los meses de Julio a Setiembre del 2012. En análisis, tabulación y evaluación de los resultados se desarrolló en el mes de Setiembre del 2012.

##### 3.1.2. Material biológico

Recolección de semen de los verracos en estudio, con 5 repeticiones para cada dilutor, raza y tiempo post dilución.

##### 3.1.3. Material de Laboratorio

###### Reactivos:

- Solución Salina

- Solución fisiológica atemperada.
- Dilutores: No se sabe exactamente los % de cada componente.  
Varía en ambos dilutores la concentración de los componentes.
  - Glucosa
  - Citrato sódico
  - Acetato potásico
  - Antibióticos
  - EDTA (etilendiaminotetraacetato disódico)
- Solución hiposmótica, composición:
  - Fructuosa (0.675 g/l)
  - Citrato de sodio (0.268 g/l)
  - Agua corriente (1l)
- Reactivos para viabilidad y morfología
  - Solución salina formulada al 0.3%.

#### **3.1.4. Material de campo**

- Mandil.
- Computadora portátil.
- Registros de animales muestreados.

#### **3.1.5. Equipo y maquinaria**

- Vasos Colectores.
- Baño María para la incubación del semen.
- Microscópio.
- Refrigerador

#### **3.1.6. Otros materiales**

- Cámara de Burker para conteo.
- Matraz aforado (100ml)

- Láminas portaobjetos y láminas cubre objetos
- Pipetas de 1ml
- Termómetro

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Muestreo:

#### a. Universo

Se consideró población o universo, a los machos reproductores en la granja en un total de 10 animales entre machos terminales y razas puras.

#### b. Tamaño de la muestra

Convenientemente el grupo de investigación, determinó que el tamaño de muestra era de 5 repeticiones de semen colectado para cada una de las razas en estudio y dilutor, esto por el tipo de investigación realizado en la presente experimentación.

#### c. Procedimiento de muestreo

Aleatoriamente se escogió los animales que cumplan las características raciales acordes al estudio. Estas razas son Raza Yorkshire y Landrace.

- **Raza Yorkshire:** muy valorada por sus características maternas, se utiliza habitualmente en cruces como línea materna. Es además, la mejor considerada entre las razas mejoradas, en cuanto a resistencia. Además es considerada la mejor raza en cuanto a valores de prolificidad, cualidades maternas, como capacidad lechera y productividad. Los

machos de esta raza se caracterizan por ser precoces, lo que le ayuda a tener una buena calidad seminal.

- **Landrace:** se destaca por englobar animales de buen comportamiento que responden satisfactoriamente ante condiciones adversas. Presentan buena ganancia media diaria en peso y conversión alimentaría, con bajo nivel de engrasamiento, considerándose por ello una raza de tipo magro. Es una raza empleada como línea pura, materna o paterna que presenta un elevado rendimiento a la canal

La frecuencia de la recolección de muestra fue semanal hasta conseguir 5 dosis por cada raza, lo que llevo a un promedio total de 10 semanas.

### 3.2.2. Métodos de evaluación

#### a. Metodología de la experimentación

Se evaluaron los indicadores de calidad espermática macroscópicos (Volumen y color del eyaculado), los indicadores de calidad espermática microscópicos (motilidad, concentración, morfología, integridad plasmática), en dos razas distintas, cada una con dos diferentes dilutores y estos a su vez en dos diferentes horas. Según metodología descrita por: Kubus®

- **Color y olor:** Se observó si el color blanquecino del semen es nítido, o está enturbiado con otros tonos, como marrón, rojizo o amarillento. La aparición de colores u olores anómalos puede ser debida a alteraciones patológicas del aparato genital o a la mezcla del semen con orina durante la eyaculación.

- **Volumen:** Se cuantificó en ml. Para realizar su medida se utilizaron probetas graduadas o una balanza, pesando el eyaculado y habiendo tarado previamente el vaso de recogida. Se considera que  $1\text{gr} = 1\text{cc}$ . El volumen normal de la fracción rica del eyaculado oscila entre 50 y 150cc aproximadamente, Varía según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco.
- **Motilidad:** Se evaluó colocando una gota pequeña del eyaculado en un portaobjetos atemperado a  $38\text{-}39^{\circ}\text{C}$ , y sobre ella se coloca el cubreobjetos. La muestra se observó a través del microscopio a 100 – 200 aumentos, evaluando el movimiento general (valoración en porcentaje. Normal mínimo 75%). En el caso de la evaluación de la motilidad en el semen conservado, se realizó con una gota de semen diluido y atemperado que nos servirá para determinar la capacidad real del movimiento de los espermatozoides.
- **Concentración:** Se realizó el recuento con la cámara de Burker. Se mezcló bien el eyaculado antes de tomar 1ml de semen puro con la ayuda de una pipeta. Se realizó una dilución 1:100 en una solución de suero fisiológico formolado al 3%, para lo que se utilizó un matraz de 50cc, entonces se añadió solamente 0.5cc de semen para mantener la misma proporción de dilución. Se homogenizó suavemente la mezcla y se tomó con una pipeta Pasteur una gota para llenar la cámara de Burker. Ajustar bien el cubreobjetos en la cámara de Burker. Situar la pipeta Pasteur entre el cubre y la cámara, dejando que el retículo de la cámara se llene por capilaridad. Se contó aquellos espermatozoides cuyas cabezas estén situadas dentro de los cuadros de la retícula y aquellos cuya

cabeza toque el lado superior, el lado derecho y las esquinas superior e inferior derechas del cuadro.

- **Morfología:** El cálculo del porcentaje de formas anormales puede realizarse: en el momento del recuento de espermatozoides en la cámara de Burker. Observando con el microscopio de campo claro con objetivo de 40 ó 100 aumentos las formas anormales existentes en 50 – 100 células contadas. Mínimo 70% de espermatozoides normales.
- **Funcionabilidad de membrana plasmática:** Esta prueba se realizó incubando 1mL de semen en 9 mL de solución hiposmótica, previamente calentada a 38°C. Se observó en el microscopio contando un total de 200 espermatozoides (mínimo 70%). Aquellos espermatozoides que presenten las colas hinchadas o enrolladas, serán considerados espermatozoides con integridad de membrana intacta (Jeyendran et al., 1984).

#### b. Recopilación de la información

- **En el campo**

Se registraron los eventos y procedimientos de colección en las fichas respectivas.

- **En el laboratorio**

Se realizaron las pruebas necesarias para la observación macroscópica, microscópica y funcional del semen conservado de porcino.

- **En la biblioteca**

Libros y revistas relacionados con el tema, revistas científicas especializadas.

- **En otros ambientes generadores de la información científica**

Páginas Web relacionadas al tema. Entrevistas con especialistas en el tema de estudio.

### 3.2.3. Variables de respuesta

#### a. Variables independientes

- Dilutores
- Tiempo
- Razas de porcinos

#### b. Variables dependientes

Macroscópico:

- Volumen (ml)
- Color (blanco lechoso, opalescente, etc.)

Microscópico:

- Motilidad (%)
- Concentración (espermatozoides por ml)
- Integridad de membrana (%)
- Morfología

### 3.3. Análisis Estadístico

#### 3.3.1 Análisis de varianza:

Análisis de varianza para un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2x2 (dos dilutores, dos tiempos de evaluación y dos razas evaluadas) cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = u + D_i + T_j + R_k + D*T*R_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable de respuesta

$u$  = Media poblacional o general, efecto medio verdadero.

$D_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo dilutor.

$T_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo tiempo de evaluación

$R_k$  = Efecto de la  $k$ -ésima raza

$DTR_{ijk}$  = Efecto de la triple interacción dilutor, tiempo y raza

$e_{ijkl}$  = error experimental.

#### 3.3.2 Pruebas no paramétricas:

Para las características macroscópicas (color) y microscópicas (morfología), se analizará con una prueba no paramétrica de Chi Cuadrado. Cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde:

$\chi^2_c$  = Chi cuadrado calculado

$O$  = Frecuencia observada.

$E$  = Frecuencia esperada.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Color de semen de porcinos considerando las dos razas.

**Cuadro N° 2**  
**Color de semen en las Razas Yorkshire y Landrace**

Animal	Landrace	Yorkshire
Porcino 1	Blanco	Blanco
Porcino 2	Blanco	Blanco
Porcino 3	Blanco	Blanco
Porcino 4	Blanco	Blanco
Porcino 5	Blanco	Blanco

En el Cuadro N° 2, se muestra el color de semen registrado en el semen de cerdo, diferenciados por raza (Landrace y Yorkshire). Los hallazgos de la presente investigación respecto a esta variable, presentaron uniformidad completa, razón por la cual no se realizó ningún diseño experimental.

En el caso del color de los eyaculados obtenidos, el color blanco corresponde al reportado por otros investigadores; al respecto, Alba (2010), menciona que el color blanco forma parte de la evaluación macroscópica e indica adecuadas condiciones de la calidad seminal, en términos de concentración de espermatozoides y de ausencia de contaminantes, dado

que la presencia de colores extraños, originan el descarte del eyaculado e inclusive del animal.

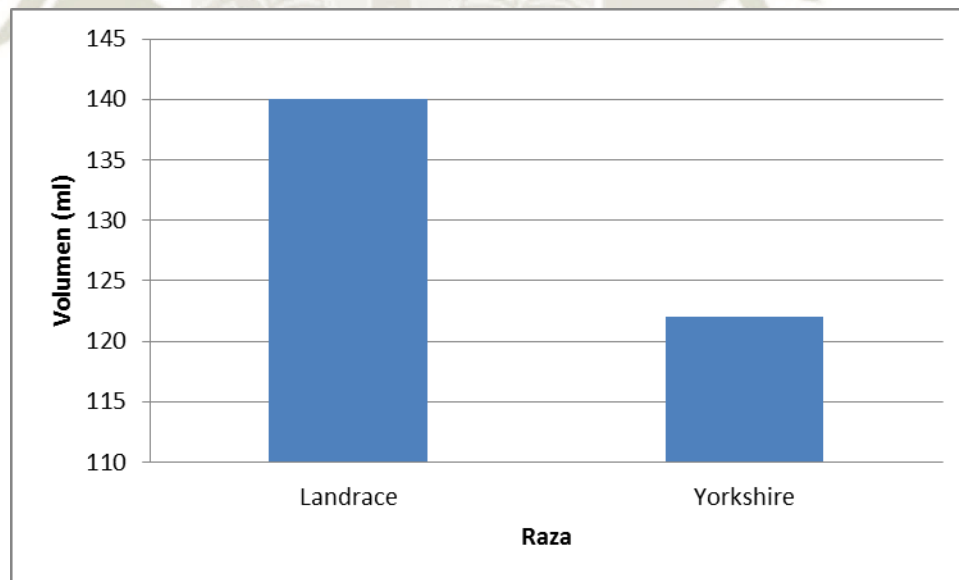
#### 4.2. Volumen de semen de porcinos considerando las dos razas.

**Cuadro N° 3**  
**Volumen Promedio de semen (ml) de porcino según raza**

Raza	Volumen (ml)	N
Landrace	140.00 <sup>a</sup>	5
Yorkshire	122.00 <sup>a</sup>	5

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia estadística significativa (Duncan  $P < 0.05$ ).

**Gráfico N° 1**  
**Volumen Promedio de semen (ml) en las Razas Yorkshire y Landrace**



En el Cuadro N° 3 y Gráfico N° 1, se representa el volumen de semen colectado en cerdos (n=5), diferenciados por raza (Landrace y Yorkshire), en los cuales podemos observar valores de 140 y 122 ml respectivamente. Luego del respectivo análisis de estadístico, sólo se observaron diferencias numéricas; sin embargo, éstas no presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ).

Los resultados hallados en la presente investigación, son similares a los reportados por otros investigadores; Rocha *et al.* (2005), realizaron una investigación para determinar los factores que afectan la producción de dosis de semen en Centros de Inseminación Artificial Porcina bajo condiciones de México; para el caso particular de la raza Yorkshire y Landrace, tampoco hallaron diferencias estadísticas significativas. Por su parte, Fuentes *et al.* (1989), reportan valores superiores de la raza Landrace sobre la Yorkshire, en términos de volumen colectado; este mismo comportamiento se ha observado en el presente estudio. Según nuestros resultados, la raza no es determinante para el volumen del eyaculado bajo condiciones de la zona de estudio.

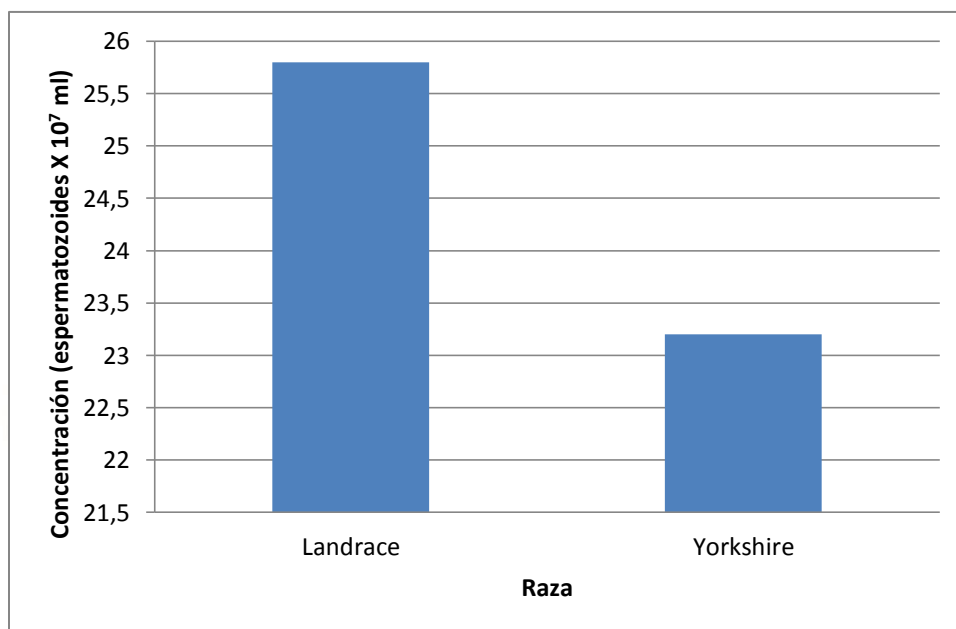
#### 4.3. Concentración (espermatozoides por ml).

**Cuadro N° 4**  
**Concentración Promedio (espermatozoides por ml) según raza**

Raza	Concentración (espermatozoides X $10^7$ ml)	N
Landrace	25,80 <sup>a</sup>	5
Yorkshire	23,20 <sup>a</sup>	5

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia estadística significativa (Duncan  $P<0.05$ ).

**Gráfico N° 2**  
**Concentración Promedio (espermatozoides por ml) en las Razas**  
**Yorkshire y Landrace**



En el Cuadro N° 4 y Gráfico N° 2, se presenta la concentración, en términos de espermatozoides por ml., en el semen colectado de cerdos (n=5), en las dos razas consideradas en la presente investigación (Landrace y Yorkshire), los valores hallados fueron de 25,80 X 10<sup>7</sup> ml y 23,20 X 10<sup>7</sup> ml, respectivamente. Luego del respectivo proceso estadístico, se apreciaron diferencias numéricas; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas (P>0.05), entre ambos valores de concentración espermática.

Respecto a nuestros resultados, estos son consistentes a los obtenidos por Alvarado et al. (2001), bajo condiciones de Lima, dichos autores mencionan que si bien existen diferencias numéricas entre ambas razas (Landrace y Yorkshire), la concentración de espermatozoides por ml, no presenta diferencia estadística significativa. Asimismo, los valores hallados se encuentran dentro del rango sugerido como concentración normal para este especie (Hafez, 2002).

#### 4.4. Efecto del dilutor

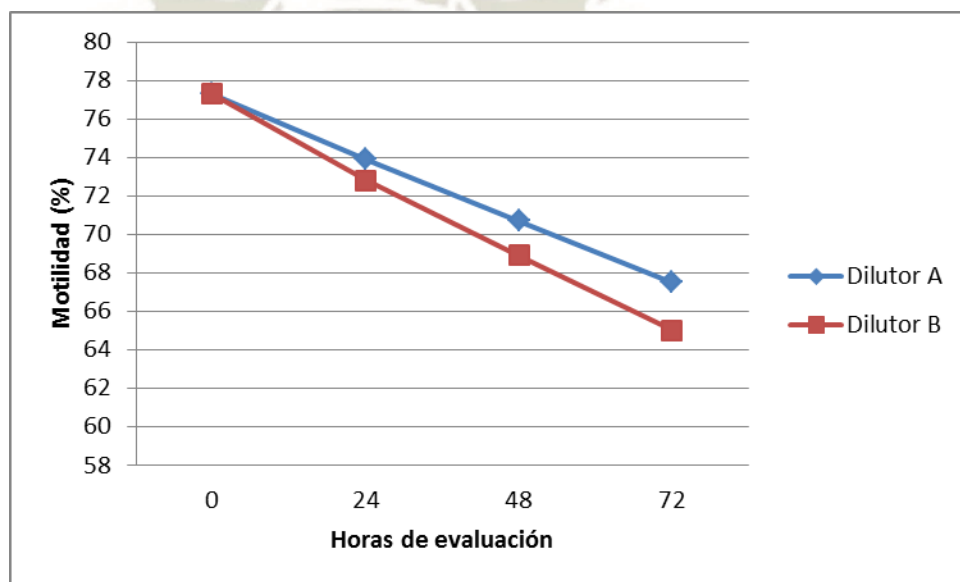
4.4.1. Promedios de mínimos cuadrados ajustados de la motilidad de semen de porcino, influenciado por el dilutor considerando cuatro horas de evaluación.

**Cuadro N° 5**  
**Motilidad Promedio (%) de semen de porcino según el dilutor y tiempo de conservación**

Dilutor	Horas			
	0	24	48	72
A	77.30 <sup>a</sup>	73.90 <sup>a</sup>	70.70 <sup>a</sup>	67.50 <sup>a</sup>
B	77.30 <sup>a</sup>	72.80 <sup>a</sup>	68.90 <sup>b</sup>	65.00 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

**Gráfico N° 3**  
**Motilidad Promedio de semen de porcino influenciado por el dilutor y tiempo de conservación**



En el Cuadro N° 5 y Gráfico N° 3, se aprecia los promedios de motilidad de semen porcino, en términos de espermatozoides por ml., en el semen colectado de cerdos (n=5), bajo efecto de dos dilutores (A y B), y evaluación en 4 momentos diferentes (0, 24, 48 y 72 horas). Luego de procesar dicha información se encontró que existe una tendencia lineal descendente de la motilidad espermática en el tiempo, asimismo, se halló diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), al comparar el efecto del dilutor en la hora 48, en las demás horas de evaluación, sólo se hallaron diferencias numéricas.

Respecto a nuestros resultados, el tipo de dilutor no regularía la motilidad de los espermatozoides en el tiempo; bajo tales consideraciones sólo se ha observado efecto significativo en la hora 48, este efecto se habría debido a diferencias en la composición de los dilutores, posiblemente originado por algunas diferencias en la concentración de potasio, dado que este ión permite mantener la actividad de la bomba sodio potasio y evita la reducción de potasio intracelular que estaría asociado con la disminución de la motilidad (Álvarez y Storey, 1982).

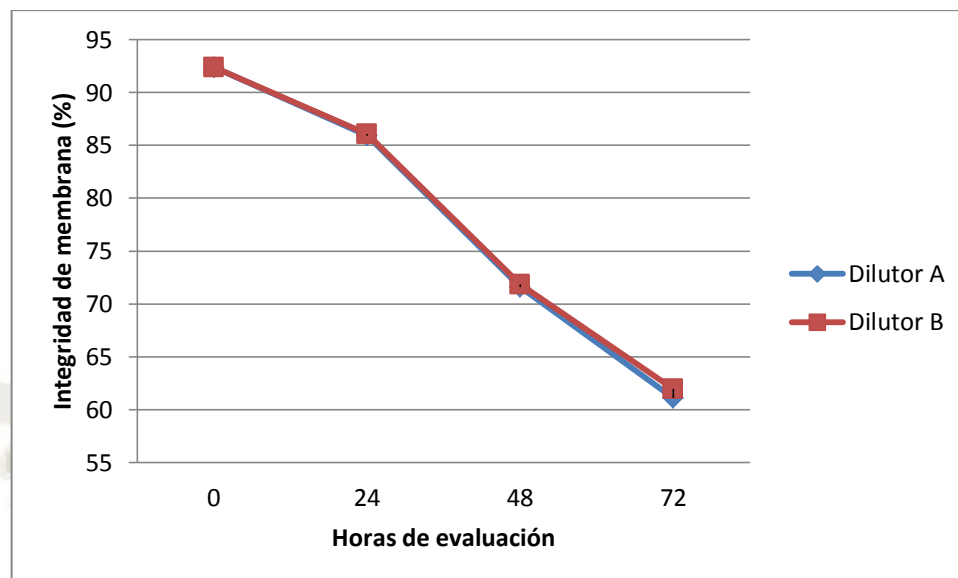
#### 4.4.2. Promedios de mínimos cuadrados ajustados de la Integridad de membrana en semen de porcino, influenciado por el dilutor considerando cuatro horas de evaluación

**Cuadro N° 6**  
**Integridad de Membrana Promedio (%) según el dilutor y tiempo de conservación**

Dilutor	Horas			
	0	24	48	72
A	92.4 <sup>a</sup>	85.9 <sup>a</sup>	71.6 <sup>a</sup>	61.1 <sup>a</sup>
B	92.4 <sup>a</sup>	86.05 <sup>a</sup>	71.85 <sup>a</sup>	61.95 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

**Gráfico N° 4**  
**Integridad de Membrana Promedio influenciado por el dilutor y tiempo de conservación**



El Cuadro N° 6 y Gráfico N° 4, representan los promedios de la integridad de membrana de espermatozoides hallados en semen porcino, bajo el efecto de dos dilutores (A y B), y en cuatro horas de evaluación (0, 24, 48 y 72 respectivamente). Luego de procesar dicha información se encontró que existe una tendencia lineal descendente de la motilidad espermática en el tiempo, asimismo, no se halló diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), al comparar el efecto del dilutor en todas las horas de evaluación, sólo se hallaron diferencias numéricas.

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles donde se manifiesta por marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de  $Ca^{2+}$  y pérdidas de  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  (De Leeuw, et al., 1990).

Estos resultados, expresados en el descenso lineal de integridad de membrana, podrían ser explicados por una desestabilización a nivel de la

membrana, producto de la conservación del semen, en donde la composición lipídica de la bicapa se ve afectada por la tasa de refrigeración. Este proceso ha sido determinado previamente en espermatozoides de ovino a temperatura inferior de 15 °C (Maxwell y Jonson, 1999). Asimismo, durante el choque por frío, los fosfolípidos interactúan con la estructura lipídica de la membrana plasmática de las células espermáticas y proveen protección.

Las lipoproteínas se unen a la membrana de la célula espermática y ayudan a conservar la integridad celular durante el almacenamiento (Bouchard et al., 1990). La estabilidad de la membrana y la resistencia al choque por frío está relacionada con el contenido de fosfolípidos de la membrana celular. Una baja proporción de fosfolípidos poliinsaturados - ácidos grasos saturados en la composición espermática, ha sido relacionada con una alta resistencia al choque por frío (Bouchard et al., 1990). La fluidez de la membrana se habría alterado por la temperatura, al descender ésta se produce un reacomodo de las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas.

De otro lado, también se ha mencionado que al descender la temperatura, disminuye la formación de ATP, por lo que la bomba sodio-potasio de la membrana plasmática (ATP dependiente) también disminuye su actividad.

Esto causa que el potasio que atraviesa la membrana para salir, fluya a una tasa mayor que el potasio que entra, por lo que la concentración de potasio intracelular disminuye, y la relación sodio-potasio se altera. Esto causa una despolarización de la membrana, abriéndose por ello los canales de calcio, el cual activa enzimas fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas (Baquero et al., 2004).

#### 4.5. Efecto de la Raza

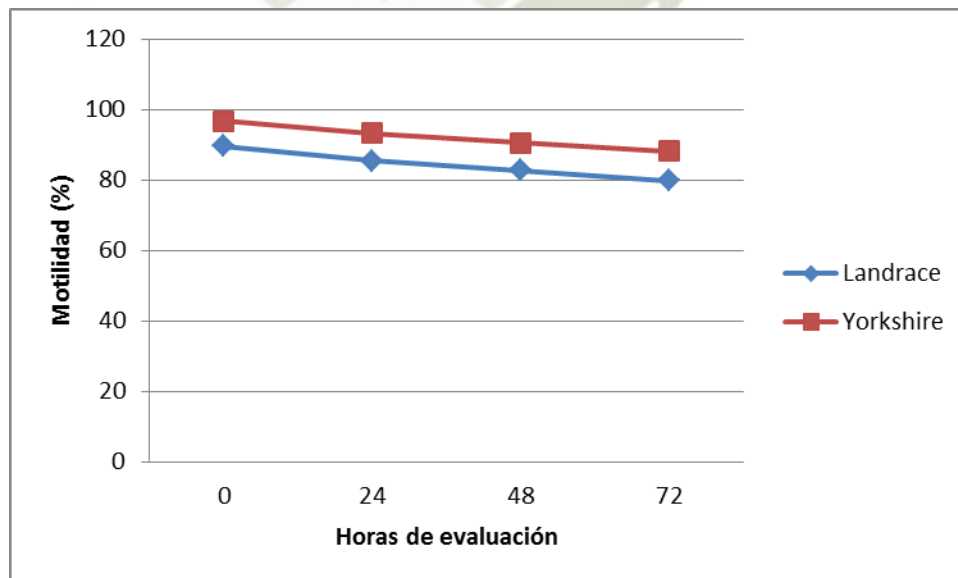
##### 4.5.1. Promedios de mínimos cuadrados ajustados de la motilidad en semen de porcino, influenciado por la raza considerando cuatro horas de evaluación.

**Cuadro N° 7**  
**Motilidad Promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación**

Raza	Horas			
	0	24	48	72
Landrace	89,60 <sup>a</sup>	85,50 <sup>a</sup>	82,70 <sup>a</sup>	79,90 <sup>a</sup>
Yorkshire	96,80 <sup>b</sup>	93,20 <sup>b</sup>	90,60 <sup>b</sup>	88,20 <sup>b</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

**Gráfico N° 5**  
**Motilidad Promedio en semen de porcino influenciado por raza y tiempo de conservación**



En el Cuadro N° 7 y Gráfico N° 5, se presentan los promedios de motilidad espermática hallados en semen porcino, bajo el efecto de dos razas en evaluación (Landrace y Yorkshire), y en cuatro horas de evaluación (0, 24, 48 y 72 respectivamente).

Luego del análisis de dicha información, se halló que existe una tendencia lineal descendente en el tiempo; asimismo, se determinaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ), durante todas las horas de evaluación. Bajo tales consideraciones se aprecia un evidente efecto de la raza sobre la motilidad espermática.

Otros autores no han reportado diferencias estadísticas al evaluar la motilidad bajo el efecto de la raza; en tal sentido, Alvarado et al. (2001), en una investigación realizada para evaluar machos de 4 razas definidas y una indefinida, bajo condiciones de Lima – Perú, mencionan que la motilidad se comporta en similares condiciones en todas las razas evaluadas, cuyos machos fueron utilizados en monta natural.

Bajo las condiciones de nuestra investigación, el efecto significativo atribuido a la raza habría obedecido al efecto combinatorio del dilutor, y principalmente al proceso de conservación de las muestras seminales. En tal sentido, los espermatozoides de la raza Yorkshire, presenta mayor adaptación al choque térmico en comparación a los espermatozoides de la raza Landrace, de acuerdo a nuestros resultados.

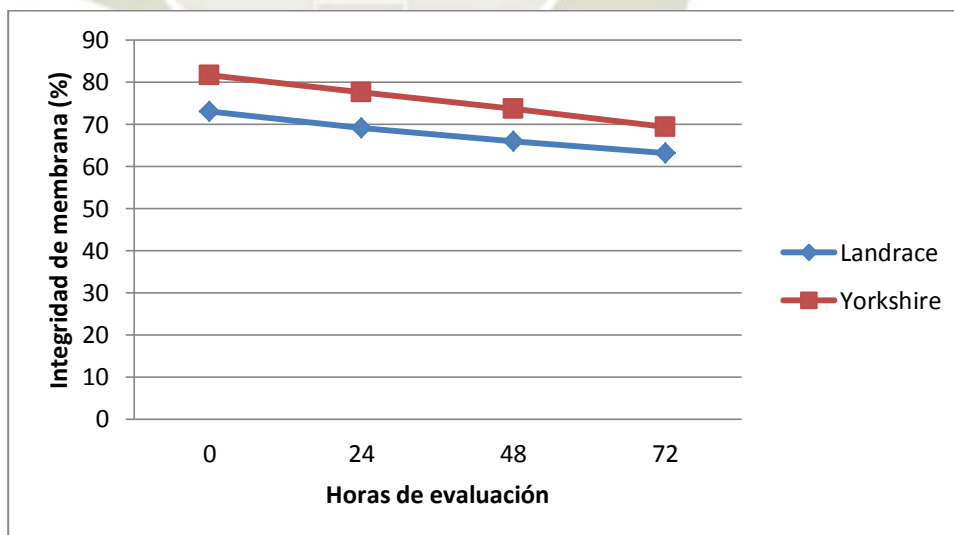
**4.5.2. Promedios de mínimos cuadrados ajustados de la Integridad de membrana en semen de porcino, influenciado por la raza considerando cuatro horas de evaluación.**

**Cuadro N° 8**  
**Integridad de membrana (%) promedio en semen de porcino según raza y tiempo de conservación**

Raza	Horas			
	0	24	48	72
Landrace	73,00 <sup>a</sup>	69,10 <sup>a</sup>	65,90 <sup>a</sup>	63,10 <sup>a</sup>
Yorkshire	81,60 <sup>b</sup>	77,60 <sup>b</sup>	73,70 <sup>b</sup>	69,40 <sup>b</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

**Gráfico N° 6**  
**Integridad de membrana promedio en semen de porcino influenciado por raza y tiempo de conservación**



El Cuadro N° 8 y el Gráfico N° 6, representan los promedios de integridad de la membrana espermática hallados en semen porcino de

dos razas (Landrace y Yorkshire), y en cuatro horas de evaluación (0, 24, 48 y 72 respectivamente). Luego del análisis de dicha información, se aprecia una tendencia lineal descendente en el tiempo; asimismo, se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ), durante todas las horas de evaluación. Bajo tales observaciones, se aprecia un evidente efecto de la raza sobre la integridad de la membrana espermática. Algunos constituyentes de la membrana espermática son altamente importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico, esto es, los fosfolípidos y los ácidos grasos (Poulos et al., 1973; Darin-Bennett et al., 1974).

De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y ovino, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada relación entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados de aproximadamente 2,5-3,3, mientras que espermatozoides de conejo y hombre presentan una relación de 1. Dicha relación tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos et al., 1973). Asimismo, comparando la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos de la membrana espermática de animales considerados como relativamente resistentes al choque térmico, como es el caso del perro y del gallo, se han observado también algunas diferencias en las proporciones relativas de estos componentes. Sin embargo, la composición en aldehídos y la relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados son semejantes en ambas especies, de aproximadamente 1 (Darin-Bennett et al., 1974). De acuerdo a nuestros resultados, las condiciones físico-químicas de la membrana plasmática del espermatozoide de los machos de la raza Yorkshire, presentaría mejores condiciones para enfrentar el choque térmico originado por la conservación del semen.

## V. CONCLUSIONES

1. Los parámetros macroscópicos observados (volumen y color), no se observaron diferencia en los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de conservación. ( $P>0.05$ ).
2. Los parámetros microscópicos observados (morfología, motilidad y concentración), no se observaron diferencia entre el dilutor y los tiempos de conservación, más entre razas si se observó diferencia en la motilidad. ( $P>0.05$ ).
3. La integridad de membrana de la Raza Yorkshire obtuvo mejores resultados, que la Raza Landrace, debido a características específicas de raza, ( $P<0.05$ ), más no así por influencia de los dilutores.
4. El factor que más influye en la calidad seminal y funcional del semen de porcino conservado es la raza. En la raza Yorkshire se encontró mayor integridad de membrana, como también una gran motilidad por parte de la misma, debido a que la raza presenta una madurez sexual más temprana que las demás razas.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que en todo el proceso de recolección se debe tener medidas estrictas tanto de higiene como manipulación del mismo, debido a que cualquier cambio físico y mecánico produce variaciones significativas en los porcentajes establecidos.
- Observar los parámetros y características de cada raza (Yorkshire y Landrace), para obtener buenos resultados dentro de una producción porcina e Inseminación Artificial, como machos terminales en cruses individuales.
- En cuanto a los dilutores se recomienda una muy buena selección del mismo para evitar así resultados negativos en cuanto al proceso de conservación y de producción por el tiempo y raza.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Alba, R. C. 2010. Protocolo práctico para la valoración de verracos destinados a la producción de dosis seminales. *Avances Tecnología Porcina VII (5)*: 2010. España.
2. Alm, K, Peltoniemi, O. A. T, Koskinen, E, y Andersson, M. (2006). Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 210 – 213.
3. Alvarado, E. C. Álvarez, P. Rebaza, y L. Alvarado. 2001. Evaluación de las características seminales y su influencia sobre el tamaño de camada de verracos usados en monta natural. *Anales Científicos*. Mayo - Agosto 2001 Volumen: XLVIII. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.
4. Alvarez J.G., y Storey B.T., 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27, 1102-1108.
5. Baquero, J., Pardo, E., y P. Cruz. 2004. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa. *Orinoquia*, año/vol. 8, número 001 Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.
6. Barth, A.D. y Waldner, C.L. Factors Affecting Breeding Soundness Classification of Beef in Saskatchewan. *Can Vet J* 2000; 43: 274-284.
7. Barth, A.D. 2003. Comprendre les taureaux d'un an. *Charo letter*. 7 (2) :18-19. December. Charolias Association du Quebec

8. Berdugo, Jesús Alfredo., y Avella, Felipe. (1994) Producción espermática. Colombia.
9. Bonet S. (1990). Inmature and aberrant spermatozoa in ejaculate of *Sus domesticus*. *Animal Reproduction Science*, 22: 67 – 80.
10. Bonet, S., y Briz, M. (1991). New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Theriogenology*, 4: 725 – 730.
11. Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Camps, R, Fradera, A, y Casadevall, M. (1995). Light microscopy characterization of sperm morphology. *Microscopy and Analysis*, 9: 29 – 31.
12. Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., García – Gil, N., y Badia, E. (2000). Morfología espermática en Porci. Institut d'Estudis Catalans. Barcelona, Spain.
13. Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., y Youngquist, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, Vol. 34, No. 1, pp. 147 – 157
14. Briz, M. D. (1994). Análisi microscòpic de l'esperma ejaculada i de la maduració epidimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*. Doctoral Thesis. University of Girona, Spain.
15. Cardellino, R.A. (1999). Animal genetic resources in southern Brazil. (Recursos genéticos del sur de Brasil). 327 – 331.
16. Castellanos, J – E. (1986). Comparación de la calidad del semen por dos métodos de obtención y el efecto al uso continuo de electroeyaculador.

Bogotá Tesis de grado (Médico Veterinario). Universidad Nacional de Colombia.

17. Chacón, J., Pérez E., Rodríguez – Martínez, H., (2002). Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman. *Theriogenology* 58.
18. Coe P. H., (1999). Association Among age, scrotal circumference and proportion of morphologically normal spermatozoa in young beef during and initial breeding soundness examination. *Javwa* vol 214 Nro 11.
19. Darin-Bennett, A.; Poulos, A.; White, I.G. (1974). The phospholipids and phospholipid bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert* 41: 471-474.
20. De Leeuw, F.E.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. (1990). - The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* 1: 95-104.
21. De Leeuw, A.M.; Den Daas, J.H.; Woelders, H. (1991) - The fix vital stain method simultaneous determination of viability and chromosomal status of bovine spermatozoa. *J. Androl* 12:112-118.
22. Echeverry J., *Las Situaciones de Estrés: Efectos en la Reproducción.* (2003)
23. Espinoza S. (2002) - *Manual de evaluación de la unidad de producción porcina.*

24. Fuentes, A.G. de Serrano, C. Regueiro y A. Valle. (1989). Efecto de la edad y raza sobre las características Reproductivas en verracos púberes. *Zootecnia Tropical*, 7(1-2): 119-139.
25. Gravance, C. G., Garner, D. I., Miller, M. G., y Berger, T. (2000). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxixology*, 15: 5 – 10.
26. Hafez, E. S. E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Sixth edition. Mc-Graw Hill Interamericana. México D.F. México.
27. Hafez, E. S. E. (2000). Reproducción de los animales domésticos. Séptima edición. Ed. Trillas. México.
28. Honeyman, M.S., Pirog, R.S., Huber, G.H., Lammers, P.J., y Hermann, J.R. (2006). The United States pork niche market phenomenon. *Kournal of Animal Science*, 84: 2269 – 2275.
29. Howes, L., y Jones, R. (2002). Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/ acrosin during fertilization. *Journal of Reproduction and Inmunology*, 53: 181 – 192.
30. Huerta Ch.G. (2011). Evaluación de Dos Dilutores sobre los Parámetros Macro, Microscópicos y Funcionales de Semen Conservado de Caninos. Arequipa.
31. Kastelic JP, Coulter GH, Falkay G, Mézes M, Bozó S, Völgyi-Csík J, Bárány I, Szász F Jr. (1998). Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein-Friesian breeding bulls. *15;51(3):215-24.*

32. Knobil, E. y Neill, J. D. (1994). *The Physiology of Reproduction*. Second edition. Raven Press. New York, USA. Pp 1063 – 1175, 1435 – 1487.
33. Kubus (2011). *Inseminación Artificial Porcina. Como ganar eficiencia con la reproducción de un ganado porcino*.
34. Kvist, U., y Bjorndahl, L. eds, (2002). *Manual on basic semen analysis*. ESHRE monographs. Oxford University Press. Oxford, UK.
35. Maxwell, W.; L. Johnson. 1999. *Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma*. *Theriogenology* 52: 1353-1362.
36. Ozaki, Y., Takahashi, K., Kanasaki, H., y Miyazaki, K. (2002). *Evaluation of acrosome reaction and viability of human sperm with two fluorescent dyes*. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 266: 114 – 117.
37. Paparella, Giuliano. (2001). *Salud Genital - Calidad Seminal*. V Seminario Internacional de la Reproducción.
38. Parks, J. E., Lee, D. R., Huang, S. Kaproth, M. T. (2003). *Prospects for spermatogenesis in vitro*. *Theriogenology* 59.
39. Pérez – Pé, R., Muiño – Blanco, T., y Cebriám – Pérez, J.A. (1985). *Sper washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold – shick damage on ram sperm membrane*. *International Journal of Andrology*, 24: 352-359.
40. Pinart, E., Camps, R, Briz, M., Bonet, S., y Egozcue, J, (1998a). *Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology*. *Animal Reproduction Science*, 49: 247 – 268.

41. Pinart, E., Briz, M., Bonet, S., y Sancho, S., (1998b). Germ cells and meiosis in unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *Advances in Reproduction*, 2: 35 – 44.
42. Pinart, E. Bussalleu, E., Yeste, M., Briz, M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Bassols, J., Pruneda, A., Casas, I., y Bonet, S. (2006). *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universidad de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina.
43. Poulos, A.; Darin-Bennett, A.; White, I.G. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol* 46B: 541-549.
44. Pruneda, A., Pinart, E., Briz, M. D., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Kadar, E., Bassols, J., Bussalleu, E., Yeste, M., y Bonet, S. (2005). Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, 63:2219 – 2232.
45. Rocha, G., Castañeda, J. y J. Valencia. (2005). Factores que afectan la producción de dosis de semen de Centros de inseminación artificial Porcina. *Avances en investigación Agropecuaria*. Septiembre, año/Vol 9 número 003. Universidad de Colima. México.
46. Sancho, S. (2002). Efectes del fotoperíode sobre la qualitat espermática de mascles porcins (*Sus domesticus*). Doctoral Thesis. University of Girona.
47. Silva, P. F. N. and Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65: 958 – 978.
48. Spitzar, J. C. (2000). Evaluación de salud reproductiva: estado actual (last update 16-oct-2000) International Veterinary Information Service, Ithaca NY.

49. Strzezek J., (1997). Regulation of biochemical mechanisms of mammalian sperm motility. *Advances in Cell Biology*, 24, 543-560.
50. Swierstra, E. E. (1973). Influence of breed, age and ejaculation frequency on boar semen composition. *Can. J. Anim. Sci.* 53: 43 – 43.
51. Swierstra, E. E. (1968<sup>a</sup>). A comparison of spermatozoa production and spermatozoa out – out of Yorkshire and Landrace boars. *J. Reprod. Fert.* 17: 459 – 469.
52. Swierstra, E. E. (1968<sup>b</sup>). Cytology and duration of cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat. Rec.* 161: 171- 186.
53. Swierstra, E. E. (1970). The effect of low ambient temperatures on sperm production, epididymal sperm reserves and semen characteristics of boars. *J. Anim. Sci.* 26: 149 – 157.
54. Weison y Johnson K. R., Dewey C. E. (1981). Prevalence of Morphology defects in Spermatozoa. *JAVMA* vol. 213 Nro. 10.
55. WHO, World Health Organization (2000). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm- Cervical Interaction*. Fourth edition. Cambridge: Cambridge University Press. Cambridge, UK.
56. Yeste O.M. (2008). *New Insights into Boar Sperm function and Survival from Integrated Field and Laboratory Studies*. Universidad de Girona – España.
57. Yeste M, Briz M, Pinart E, Sancho N, et al. (2008). Boar spermatozoa and prostaglandin F2 $\alpha$  Quality of boar sperm after addition of prostaglandin F2 $\alpha$  to the short-term extender over cooling time. *Animal Reproduction Science*, 108 (1-2): 180-195.

## VIII. ANEXOS

### 8.1. Fichas

#### FICHA DE LABORATORIO.

##### LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 1

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 11/07/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	160ml	160ml	160ml	160ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	95%	92%	90%	90%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	76% N 8% CL 16% GD	61% N 39% CL	64% N 18% CL 18% GD	49% N 47% CL 4% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	24x 10 <sup>7</sup>	21 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>	23 x 10 <sup>7</sup>
<b>Integridad de membrana (%)</b>	60%	57%	55%	50%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 1

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 11/07/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	160ml	160ml	160ml	160ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	95%	90%	90%	88%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	76% N 8% CL 16% GD	56% N 31% CL 13% GD	53% N 29% CL 18% GD	64% N 29% CL 7% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$24 \times 10^7$	$16 \times 10^7$	$17 \times 10^7$	$14 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	60%	60%	57%	53%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 2

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 16/07/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	180ml	180ml	180ml	180ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	80%	80%	75%	70%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	80% N 10% CL 10% GD	60% N 10% CL 30% GD	55% N 40% CL 5% GD	50% N 40% CL 10% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$39 \times 10^7$	$10 \times 10^7$	$11 \times 10^7$	$10 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	72%	70%	65%	62%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 2

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 16/07/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	180ml	180ml	180ml	180ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	80%	78%	75%	70%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	80% N 10% CL 10% GD	55% N 30% CL 15% GD	55% N 27% CL 18% GD	54% N 31% CL 15% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$39 \times 10^7$	$13 \times 10^7$	$11 \times 10^7$	$14 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	72%	65%	62%	60%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 3

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 23/07/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	85%	80%	75%	70%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	70% N 20% CL 10% GD	74% N 13% CL 13% GD	67% N 25% CL 8% GD	60% N 20% CL 20% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$18 \times 10^7$	$15 \times 10^7$	$12 \times 10^7$	$10 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	70%	68%	65%	62%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 3

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 23/07/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	85%	80%	75%	70%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	70% N 20% CL 10% GD	77% N 8% CL 15% GD	71% N 29% CL	67% N 33% CL
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$18 \times 10^7$	$13 \times 10^7$	$7 \times 10^7$	$6 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	70%	65%	62%	60%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 4

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 31/07/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	95%	92%	90%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	87% N 13% CL	78% N 22% CL	75% N 25% CL	62% N 25% CL 13% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$26 \times 10^7$	$9 \times 10^7$	$8 \times 10^7$	$8 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	85%	80%	76%	71%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 4

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 31/07/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	95%	90%	88%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	87% N 13% CL	69% N 23% CL 8% GD	69% N 23% CL 8% GD	64% N 18% CL 18% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$26 \times 10^7$	$13 \times 10^7$	$13 \times 10^7$	$11 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	85%	79%	75%	71%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 5

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 14/08/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	90%	88%	87%	85%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	64% N 9% CL 27% GD	62% N 10% CL 28% GD	58% N 15% CL 27% GD	56% N 12% CL 32% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$22 \times 10^7$	$20 \times 10^7$	$17 \times 10^7$	$15 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	78%	75%	72%	71%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** LL-CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Landrace

**OBSERVACIONES:** Muestra 5

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 14/08/2012 11:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	90%	89%	86%	83%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	64% N 9% CL 27% GD	61% N 11% CL 28% GD	59% N 13% CL 28% GD	58% N 12% CL 30% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$22 \times 10^7$	$21 \times 10^7$	$19 \times 10^7$	$16 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	78%	77%	74%	71%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 1

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 03/07/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	95%	90%	88%	85%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	100% N	95% N 5% GD	82% N 9% CL 9% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$21 \times 10^7$	$20 \times 10^7$	$18 \times 10^7$	$21 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	80%	75%	70%	60%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 1

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 03/07/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	95%	88%	85%	83%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	100% N	88% N 6% CL 6% GD	80% N 4% CL 8% GD 8% GP
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$21 \times 10^7$	$18 \times 10^7$	$15 \times 10^7$	$24 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	80%	70%	63%	54%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 2

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 09/07/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	97%	95%	92%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	90% N 6% GP 5% GD	82% N 6% CL 12% GD	73% N 20% CL 7% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$21 \times 10^7$	$20 \times 10^7$	$17 \times 10^7$	$15 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	79%	78%	75%	72%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 2

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 09/07/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	95%	93%	90%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	94% N 6% GD	81% N 13% CL 6% GD	72% N 14% CL 14% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$21 \times 10^7$	$17 \times 10^7$	$15 \times 10^7$	$14 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	79%	76%	74%	70%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 3

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 21/08/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	96%	95%	92%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	94% N 6% CL	88% N 6% CL 6% GD	79% N 14% CL 7% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$20 \times 10^7$	$17 \times 10^7$	$15 \times 10^7$	$14 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	82%	79%	78%	76%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 3

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 21/08/2012 9:45am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	95%	92%	89%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	94% N 6% CL	82% N 6% CL 12% GD	80% N 10% CL 10% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$20 \times 10^7$	$16 \times 10^7$	$13 \times 10^7$	$10 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	82%	78%	74%	70%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 4

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 27/08/2012 10:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	130ml	130ml	130ml	130ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	95%	92%	89%	87%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	100% N	90% N 10% CL	82% N 12% CL 6% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$25 \times 10^7$	$23 \times 10^7$	$19 \times 10^7$	$16 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	82%	79%	75%	73%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 4

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 27/08/2012 10:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	130ml	130ml	130ml	130ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	95%	92%	89%	87%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	100% N	95% N 5% CL	88% N 6% CL 6% GD
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$25 \times 10^7$	$21 \times 10^7$	$18 \times 10^7$	$15 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	80%	76%	69%	66%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR A)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

**OBSERVACIONES:** Muestra 5

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 03/09/2012 9:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	95%	92%	90%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	100% N	94% N 6% GD	90% N 10% CL
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$29 \times 10^7$	$25 \times 10^7$	$17 \times 10^7$	$15 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	85%	83%	80%	78%

**FICHA DE LABORATORIO.**

**LECTURA DE EVALUACION SEMINAL (DILUTOR B)**

**IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL:** YY- CA

**RAZA DEL ANIMAL:** Yorkshire

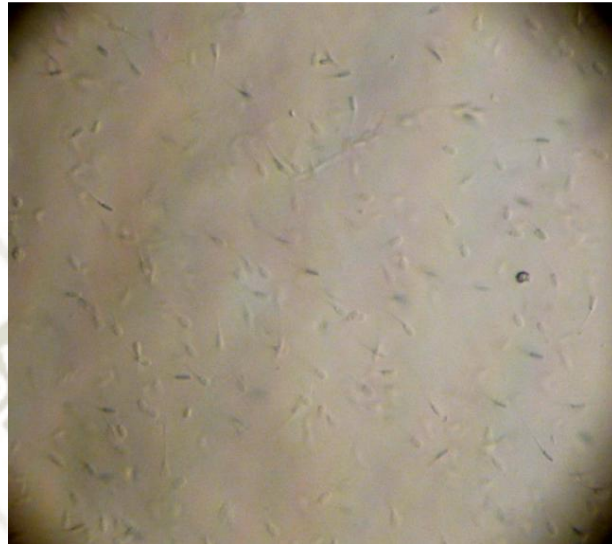
**OBSERVACIONES:** Muestra 5

**FECHA Y HORA OBTENCION MUESTRA:** 03/09/2012 9:00am

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 48	HORA 72
<b>Volumen (ml)</b>	120ml	120ml	120ml	120ml
<b>Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Motilidad (%)</b>	98%	95%	92%	90%
<b>Morfología (% de cada categoría)</b>	100% N	100% N	90% N 10% CL	88% N 12% CL
<b>Concentración (espermatozoide por ml)</b>	$29 \times 10^7$	$23 \times 10^7$	$15 \times 10^7$	$13 \times 10^7$
<b>Integridad de membrana (%)</b>	85%	82%	79%	75%

## 8.2. Fotos

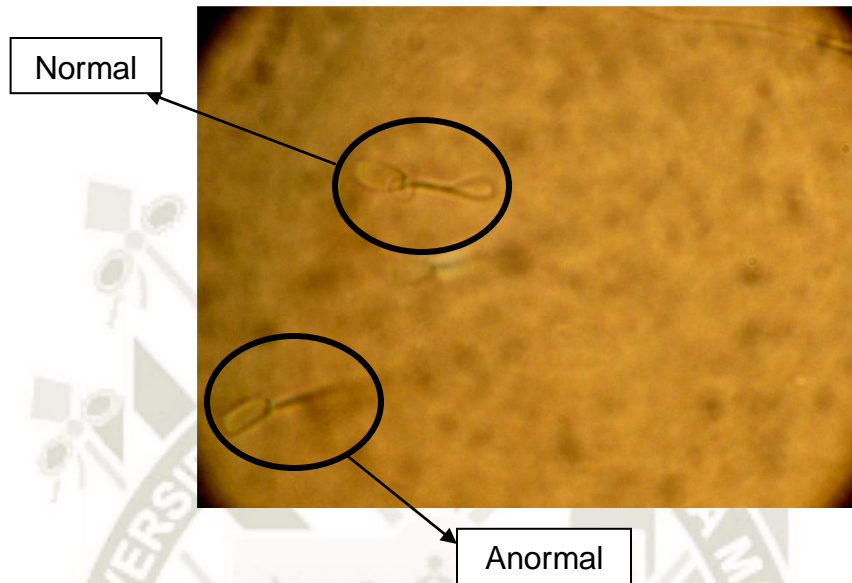
**Foto11**  
**Motilidad Espermática**



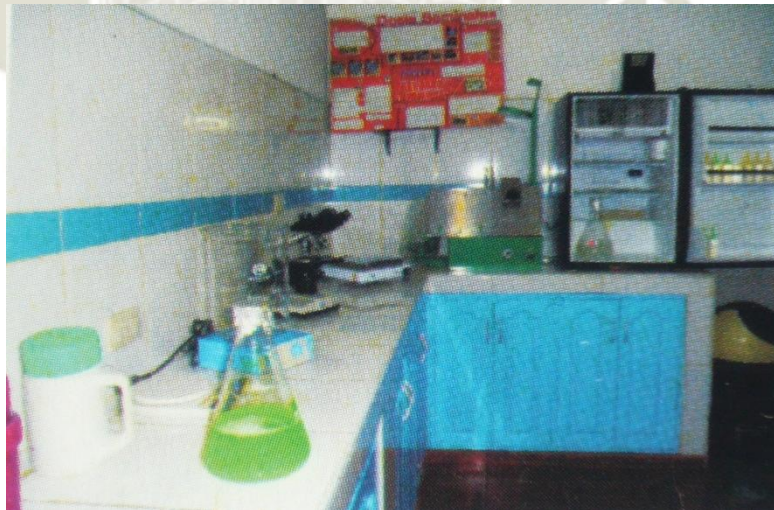
**Foto 12**  
**Concentración y Morfología en la Cámara de Burker**



**Foto 13**  
**Integridad de Membrana**



**Foto 14**  
**Laboratorio**





### 8.3. Análisis estadístico.

#### ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

Obs	R	D	H	V	M	C	I
1	1	1	1	80	95	24	60
2	1	1	1	90	80	39	72
3	1	1	1	60	85	18	70
4	1	1	1	60	98	26	85
5	1	1	1	60	90	22	78
6	1	1	2	80	80	21	57
7	1	1	2	90	80	10	70
8	1	1	2	60	80	15	68
9	1	1	2	60	95	19	75
10	1	1	2	60	88	20	75
11	1	1	3	80	75	16	55
12	1	1	3	90	75	11	65
13	1	1	3	60	87	12	65
14	1	1	3	60	87	18	72
15	1	1	3	60	87	17	72
16	1	1	4	80	90	10	50
17	1	1	4	90	70	10	62
18	1	1	4	60	70	10	62
19	1	1	4	60	85	18	71
20	1	1	4	60	85	15	71
21	1	2	1	80	95	24	60
22	1	2	1	90	80	39	72
23	1	2	1	60	85	18	70
24	1	2	1	60	98	26	85
25	1	2	1	60	90	22	78
26	1	2	2	80	90	16	60
27	1	2	2	90	78	13	65
28	1	2	2	60	80	13	65
29	1	2	2	60	95	13	79
30	1	2	2	60	89	21	77
31	1	2	3	80	90	17	57
32	1	2	3	90	75	11	62
33	1	2	3	60	75	7	62
34	1	2	3	60	90	13	75
35	1	2	3	60	86	19	74
36	1	2	4	80	88	14	53
37	1	2	4	90	70	14	60
38	1	2	4	60	70	6	60
39	1	2	4	60	88	11	71
40	1	2	4	60	83	16	71
41	2	1	1	60	95	21	80

42	2	1	1	60	98	21	79
43	2	1	1	60	98	20	82
44	2	1	1	65	95	25	82
45	2	1	1	60	98	29	85
46	2	1	2	60	90	20	75
47	2	1	2	60	97	20	78
48	2	1	2	60	96	17	79
49	2	1	2	65	92	23	79
50	2	1	2	60	95	25	83
51	2	1	3	60	88	18	70
52	2	1	3	60	95	17	75
53	2	1	3	60	95	15	78
54	2	1	3	65	89	19	75
55	2	1	3	60	92	17	80
56	2	1	4	60	85	21	60
57	2	1	4	60	92	15	72
58	2	1	4	60	92	14	76
59	2	1	4	65	87	16	73
60	2	1	4	60	90	15	78
61	2	2	1	60	95	21	80
62	2	2	1	60	98	21	79
63	2	2	1	60	98	20	82
64	2	2	1	65	95	25	82
65	2	2	1	60	98	29	85
66	2	2	2	60	88	18	70
67	2	2	2	60	95	17	76
68	2	2	2	60	95	16	78
69	2	2	2	65	90	21	76
70	2	2	2	60	94	23	82
71	2	2	3	60	85	15	63
72	2	2	3	60	93	15	74
73	2	2	3	60	92	13	74
74	2	2	3	65	87	18	69
75	2	2	3	60	90	15	79
76	2	2	4	60	83	24	54
77	2	2	4	60	90	14	70
78	2	2	4	60	89	10	70
79	2	2	4	65	85	15	66
80	2	2	4	60	89	13	75

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
R	2	1 2
D	2	1 2
H	4	1 2 3 4

Number of observations 80  
ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure

Dependent Variable: V

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	1620.000000	135.000000	1.38	0.1981
Error	67	6560.000000	97.910448		
Corrected Total	79	8180.000000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	V Mean
0.198044	15.10683	9.894971	65.50000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	1620.000000	1620.000000	16.55	0.0001
D	1	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
H	3	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
R*D	1	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
R*H	3	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
D*H	3	0.000000	0.000000	0.00	1.0000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	1620.000000	1620.000000	16.55	0.0001
D	1	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
H	3	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
R*D	1	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
R*H	3	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
D*H	3	0.000000	0.000000	0.00	1.0000

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure

Dependent Variable: M

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	2161.750000	180.145833	5.54	<.0001
Error	67	2179.437500	32.528918		
Corrected Total	79	4341.187500			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	M Mean
0.497963	6.458217	5.703413	88.31250

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	1209.012500	1209.012500	37.17	<.0001
D	1	3.612500	3.612500	0.11	0.7400
H	3	917.937500	305.979167	9.41	<.0001
R*D	1	23.112500	23.112500	0.71	0.4023
R*H	3	3.137500	1.045833	0.03	0.9922
D*H	3	4.937500	1.645833	0.05	0.9848

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	1209.012500	1209.012500	37.17	<.0001
D	1	3.612500	3.612500	0.11	0.7400
H	3	917.937500	305.979167	9.41	<.0001
R*D	1	23.112500	23.112500	0.71	0.4023
R*H	3	3.137500	1.045833	0.03	0.9922
D*H	3	4.937500	1.645833	0.05	0.9848

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure

Dependent Variable: C

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	1541.150000	128.429167	6.99	<.0001
Error	67	1231.537500	18.381157		
Corrected Total	79	2772.687500			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	C Mean
0.555833	23.90146	4.287325	17.93750

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	56.112500	56.112500	3.05	0.0852
D	1	23.112500	23.112500	1.26	0.2661
H	3	1319.237500	439.745833	23.92	<.0001
R*D	1	0.612500	0.612500	0.03	0.8557
R*H	3	130.237500	43.412500	2.36	0.0791
D*H	3	11.837500	3.945833	0.21	0.8859

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	56.112500	56.112500	3.05	0.0852
D	1	23.112500	23.112500	1.26	0.2661
H	3	1319.237500	439.745833	23.92	<.0001
R*D	1	0.612500	0.612500	0.03	0.8557
R*H	3	130.237500	43.412500	2.36	0.0791
D*H	3	11.837500	3.945833	0.21	0.8859

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure

Dependent Variable: I

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	2674.250000	222.854167	4.96	<.0001
Error	67	3007.300000	44.885075		
Corrected Total	79	5681.550000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	I Mean
0.470690	9.347237	6.699632	71.67500

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	1216.800000	1216.800000	27.11	<.0001
D	1	36.450000	36.450000	0.81	0.3707
H	3	1347.850000	449.283333	10.01	<.0001
R*D	1	39.200000	39.200000	0.87	0.3534
R*H	3	16.900000	5.633333	0.13	0.9447
D*H	3	17.050000	5.683333	0.13	0.9440

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
R	1	1216.800000	1216.800000	27.11	<.0001
D	1	36.450000	36.450000	0.81	0.3707
H	3	1347.850000	449.283333	10.01	<.0001
R*D	1	39.200000	39.200000	0.87	0.3534
R*H	3	16.900000	5.633333	0.13	0.9447
D*H	3	17.050000	5.683333	0.13	0.9440

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

H0:LSMean1=				
R	V LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	70.0000000	1.5645323	<.0001	0.0001
2	61.0000000	1.5645323	<.0001	

H0:LSMean1=				
R	M LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	84.4250000	0.9017887	<.0001	<.0001
2	92.2000000	0.9017887	<.0001	

H0:LSMean1=				
R	C LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	17.1000000	0.6778856	<.0001	0.0852
2	18.7750000	0.6778856	<.0001	

H0:LSMean1=				
R	I LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	67.7750000	1.0593049	<.0001	<.0001
2	75.5750000	1.0593049	<.0001	

H0:LSMean1=				
D	V LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	65.5000000	1.5645323	<.0001	1.0000
2	65.5000000	1.5645323	<.0001	

H0:LSMean1=				
D	M LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	88.5250000	0.9017887	<.0001	0.7400
2	88.1000000	0.9017887	<.0001	

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

H0:LSMean1=				
D	C LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	18.4750000	0.6778856	<.0001	0.2661
2	17.4000000	0.6778856	<.0001	

H0:LSMean1=				
D	I LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr >  t	LSMean2 Pr >  t
1	72.3500000	1.0593049	<.0001	0.3707
2	71.0000000	1.0593049	<.0001	

H	V LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	65.5000000	2.2125827	<.0001	1
2	65.5000000	2.2125827	<.0001	2
3	65.5000000	2.2125827	<.0001	3
4	65.5000000	2.2125827	<.0001	4

Least Squares Means for effect H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: V

i/j	1	2	3	4
1		1.0000	1.0000	1.0000
2	1.0000		1.0000	1.0000
3	1.0000	1.0000		1.0000
4	1.0000	1.0000	1.0000	

H	M LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	93.2000000	1.2753219	<.0001	1
2	89.3500000	1.2753219	<.0001	2
3	86.6500000	1.2753219	<.0001	3
4	84.0500000	1.2753219	<.0001	4

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

Least Squares Means for effect H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: M

i/j	1	2	3	4
1		0.0365	0.0005	<.0001
2	0.0365		0.1391	0.0045
3	0.0005	0.1391		0.1541
4	<.0001	0.0045	0.1541	

H	C LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	24.5000000	0.9586750	<.0001	1
2	18.0500000	0.9586750	<.0001	2
3	15.1500000	0.9586750	<.0001	3
4	14.0500000	0.9586750	<.0001	4

Least Squares Means for effect H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: C

i/j	1	2	3	4
1		<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		0.0361	0.0044
3	<.0001	0.0361		0.4200
4	<.0001	0.0044	0.4200	



H	Standard		LSMEAN	
	I LSMEAN	Error	Pr >  t	Number
1	77.3000000	1.4980834	<.0001	1
2	73.3500000	1.4980834	<.0001	2
3	69.8000000	1.4980834	<.0001	3
4	66.2500000	1.4980834	<.0001	4

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

Least Squares Means for effect H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: I

i/j	1	2	3	4
1		0.0666	0.0007	<.0001
2	0.0666		0.0985	0.0013
3	0.0007	0.0985		0.0985
4	<.0001	0.0013	0.0985	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

R	D	Standard		LSMEAN	
		V LSMEAN	Error	Pr >  t	Number
1	1	70.0000000	2.2125827	<.0001	1
1	2	70.0000000	2.2125827	<.0001	2
2	1	61.0000000	2.2125827	<.0001	3
2	2	61.0000000	2.2125827	<.0001	4

Least Squares Means for effect R\*D  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: V

i/j	1	2	3	4
1		1.0000	0.0054	0.0054
2	1.0000		0.0054	0.0054
3	0.0054	0.0054		1.0000
4	0.0054	0.0054	1.0000	

R	D	M LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	1	84.1000000	1.2753219	<.0001	1
1	2	84.7500000	1.2753219	<.0001	2
2	1	92.9500000	1.2753219	<.0001	3
2	2	91.4500000	1.2753219	<.0001	4

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

Least Squares Means for effect R\*D  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: M

i/j	1	2	3	4
1		0.7197	<.0001	0.0001
2	0.7197		<.0001	0.0004
3	<.0001	<.0001		0.4085
4	0.0001	0.0004	0.4085	

R	D	C LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	1	17.5500000	0.9586750	<.0001	1
1	2	16.6500000	0.9586750	<.0001	2
2	1	19.4000000	0.9586750	<.0001	3
2	2	18.1500000	0.9586750	<.0001	4

Least Squares Means for effect R\*D  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: C

i/j	1	2	3	4
1		0.5091	0.1770	0.6595
2	0.5091		0.0465	0.2725
3	0.1770	0.0465		0.3598
4	0.6595	0.2725	0.3598	

R	D	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	67.7500000	1.4980834	<.0001	1
1	2	67.8000000	1.4980834	<.0001	2
2	1	76.9500000	1.4980834	<.0001	3
2	2	74.2000000	1.4980834	<.0001	4

#### ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

Least Squares Means for effect R\*D  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: I

i/j	1	2	3	4
1		0.9812	<.0001	0.0033
2	0.9812		<.0001	0.0036
3	<.0001	<.0001		0.1987
4	0.0033	0.0036	0.1987	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.



R	H	V	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	70.0000000	3.1290645	<.0001	1	
1	2	70.0000000	3.1290645	<.0001	2	
1	3	70.0000000	3.1290645	<.0001	3	
1	4	70.0000000	3.1290645	<.0001	4	
2	1	61.0000000	3.1290645	<.0001	5	
2	2	61.0000000	3.1290645	<.0001	6	
2	3	61.0000000	3.1290645	<.0001	7	
2	4	61.0000000	3.1290645	<.0001	8	

Least Squares Means for effect R\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: V

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		1.0000	1.0000	1.0000	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459
2	1.0000		1.0000	1.0000	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459
3	1.0000	1.0000		1.0000	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459
4	1.0000	1.0000	1.0000		0.0459	0.0459	0.0459	0.0459
5	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459		1.0000	1.0000	1.0000
6	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459	1.0000		1.0000	1.0000
7	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459	1.0000	1.0000		1.0000
8	0.0459	0.0459	0.0459	0.0459	1.0000	1.0000	1.0000	

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

R	H	M	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	89.6000000	1.8035775	<.0001	1	
1	2	85.5000000	1.8035775	<.0001	2	
1	3	82.7000000	1.8035775	<.0001	3	
1	4	79.9000000	1.8035775	<.0001	4	
2	1	96.8000000	1.8035775	<.0001	5	
2	2	93.2000000	1.8035775	<.0001	6	
2	3	90.6000000	1.8035775	<.0001	7	
2	4	88.2000000	1.8035775	<.0001	8	

Least Squares Means for effect R\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: M

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.1127	0.0086	0.0003	0.0063	0.1628	0.6963	0.5849
2	0.1127		0.2762	0.0316	<.0001	0.0036	0.0496	0.2936
3	0.0086	0.2762		0.2762	<.0001	0.0001	0.0029	0.0347
4	0.0003	0.0316	0.2762		<.0001	<.0001	<.0001	0.0018
5	0.0063	<.0001	<.0001	<.0001		0.1628	0.0178	0.0012
6	0.1628	0.0036	0.0001	<.0001	0.1628		0.3117	0.0541
7	0.6963	0.0496	0.0029	<.0001	0.0178	0.3117		0.3501
8	0.5849	0.2936	0.0347	0.0018	0.0012	0.0541	0.3501	

R	H	C	Standard LSMEAN	Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	25.8000000	1.3557712	<.0001	1	
1	2	16.1000000	1.3557712	<.0001	2	
1	3	14.1000000	1.3557712	<.0001	3	
1	4	12.4000000	1.3557712	<.0001	4	
2	1	23.2000000	1.3557712	<.0001	5	
2	2	20.0000000	1.3557712	<.0001	6	
2	3	16.2000000	1.3557712	<.0001	7	
2	4	15.7000000	1.3557712	<.0001	8	

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

Least Squares Means for effect R\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: C

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		<.0001	<.0001	<.0001	0.1796	0.0035	<.0001	<.0001
2	<.0001		0.3006	0.0579	0.0004	0.0459	0.9586	0.8354
3	<.0001	0.3006		0.3784	<.0001	0.0030	0.2773	0.4070
4	<.0001	0.0579	0.3784		<.0001	0.0002	0.0516	0.0898
5	0.1796	0.0004	<.0001	<.0001		0.0998	0.0005	0.0002
6	0.0035	0.0459	0.0030	0.0002	0.0998		0.0516	0.0282
7	<.0001	0.9586	0.2773	0.0516	0.0005	0.0516		0.7951
8	<.0001	0.8354	0.4070	0.0898	0.0002	0.0282	0.7951	

R	H	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	73.0000000	2.1186098	<.0001	1
1	2	69.1000000	2.1186098	<.0001	2
1	3	65.9000000	2.1186098	<.0001	3
1	4	63.1000000	2.1186098	<.0001	4
2	1	81.6000000	2.1186098	<.0001	5
2	2	77.6000000	2.1186098	<.0001	6
2	3	73.7000000	2.1186098	<.0001	7
2	4	69.4000000	2.1186098	<.0001	8

Least Squares Means for effect R\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: I

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.1975	0.0207	0.0015	0.0055	0.1294	0.8160	0.2338
2	0.1975		0.2893	0.0493	<.0001	0.0060	0.1294	0.9205
3	0.0207	0.2893		0.3534	<.0001	0.0002	0.0114	0.2469
4	0.0015	0.0493	0.3534		<.0001	<.0001	0.0007	0.0393
5	0.0055	<.0001	<.0001	<.0001		0.1864	0.0104	0.0001
6	0.1294	0.0060	0.0002	<.0001	0.1864		0.1975	0.0079
7	0.8160	0.1294	0.0114	0.0007	0.0104	0.1975		0.1559
8	0.2338	0.9205	0.2469	0.0393	0.0001	0.0079	0.155	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

comparisons should be used.

D	H	V	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	65.5000000	3.1290645	<.0001	1	
1	2	65.5000000	3.1290645	<.0001	2	
1	3	65.5000000	3.1290645	<.0001	3	
1	4	65.5000000	3.1290645	<.0001	4	
2	1	65.5000000	3.1290645	<.0001	5	
2	2	65.5000000	3.1290645	<.0001	6	
2	3	65.5000000	3.1290645	<.0001	7	
2	4	65.5000000	3.1290645	<.0001	8	

Least Squares Means for effect D\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: V

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
2	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
4	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000
6	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000
7	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		1.0000
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	

D	H	M	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	93.2000000	1.8035775	<.0001	1	
1	2	89.3000000	1.8035775	<.0001	2	
1	3	87.0000000	1.8035775	<.0001	3	
1	4	84.6000000	1.8035775	<.0001	4	
2	1	93.2000000	1.8035775	<.0001	5	
2	2	89.4000000	1.8035775	<.0001	6	

2 3 86.300000 1.8035775 <.0001 7  
2 4 83.500000 1.8035775 <.0001 8  
ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

Least Squares Means for effect D\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: M

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.1310	0.0178	0.0012	1.0000	0.1410	0.0086	0.0003
2	0.1310		0.3704	0.0698	0.1310	0.9688	0.2437	0.0262
3	0.0178	0.3704		0.3501	0.0178	0.3501	0.7846	0.1746
4	0.0012	0.0698	0.3501		0.0012	0.0642	0.5074	0.6677
5	1.0000	0.1310	0.0178	0.0012		0.1410	0.0086	0.0003
6	0.1410	0.9688	0.3501	0.0642	0.1410		0.2285	0.0238
7	0.0086	0.2437	0.7846	0.5074	0.0086	0.2285		0.2762
8	0.0003	0.0262	0.1746	0.6677	0.0003	0.0238	0.2762	

D	H	C	Standard LSMEAN	Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	1	24.5000000	1.3557712	<.0001	1	
1	2	19.0000000	1.3557712	<.0001	2	
1	3	16.0000000	1.3557712	<.0001	3	
1	4	14.4000000	1.3557712	<.0001	4	
2	1	24.5000000	1.3557712	<.0001	5	
2	2	17.1000000	1.3557712	<.0001	6	
2	3	14.3000000	1.3557712	<.0001	7	
2	4	13.7000000	1.3557712	<.0001	8	

Least Squares Means for effect D\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: C

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.0055	<.0001	<.0001	1.0000	0.0003	<.0001	<.0001
2	0.0055		0.1224	0.0192	0.0055	0.3253	0.0168	0.0074
3	<.0001	0.1224		0.4070	<.0001	0.5681	0.3784	0.2345



4	<.0001	0.0192	0.4070		<.0001	0.1637	0.9586	0.7162
5	1.0000	0.0055	<.0001	<.0001		0.0003	<.0001	<.0001
6	0.0003	0.3253	0.5681	0.1637	0.0003		0.1489	0.0807
7	<.0001	0.0168	0.3784	0.9586	<.0001	0.1489		0.7553
8	<.0001	0.0074	0.2345	0.7162	<.0001	0.0807	0.7553	

ARREGLO FACTORIAL SEMEN PORCINO

The GLM Procedure  
Least Squares Means

D	H	LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
1	1	77.3000000	2.1186098	<.0001	1
1	2	73.9000000	2.1186098	<.0001	2
1	3	70.7000000	2.1186098	<.0001	3
1	4	67.5000000	2.1186098	<.0001	4
2	1	77.3000000	2.1186098	<.0001	5
2	2	72.8000000	2.1186098	<.0001	6
2	3	68.9000000	2.1186098	<.0001	7
2	4	65.0000000	2.1186098	<.0001	8

Least Squares Means for effect D\*H  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: I

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.2605	0.0311	0.0017	1.0000	0.1378	0.0066	0.0001
2	0.2605		0.2893	0.0363	0.2605	0.7147	0.0998	0.0041
3	0.0311	0.2893		0.2893	0.0311	0.4858	0.5500	0.0614
4	0.0017	0.0363	0.2893		0.0017	0.0815	0.6418	0.4070
5	1.0000	0.2605	0.0311	0.0017		0.1378	0.0066	0.0001
6	0.1378	0.7147	0.4858	0.0815	0.1378		0.1975	0.0114
7	0.0066	0.0998	0.5500	0.6418	0.0066	0.1975		0.1975
8	0.0001	0.0041	0.0614	0.4070	0.0001	0.0114	0.1975	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used