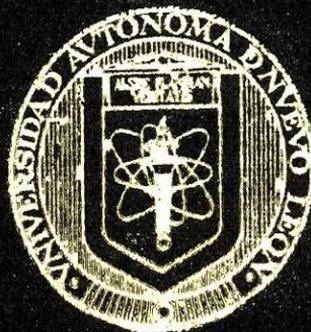


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



CRIOPRESERVACION DE ESPERMA
DE CERDO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

PRESENTA

FERNANDO CAVAZOS RODRIGUEZ

MARIN, N. L.

JUNIO DE 1990

S.F. 396

.M6

638

c.1



1080061088

Este libro debe ser devuelto, a más tardar, en la última fecha sellada, su retención más allá de la fecha de vencimiento, lo hace acreedor a las multas que fija el reglamento.

9/12/1992

2/4/1992

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



CRIOPRESERVACION DE ESPERMA
DE CERDO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA
PRESENTA

FERNANDO CAVAZOS RODRIGUEZ

MARIN, N. L.

JUNIO DE 1990

10285

T
SF396
.M6
C39



040.636
FA9.
1990
e.5

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



CRIOPRESERVACION DE ESPERMA DE CERDO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

PRESENTA
FERNANDO CAVAZOS RODRIGUEZ

Marín, N. L.

Junio 1990

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

CRIOPRESERVACION DE ESPERMA DE CERDO

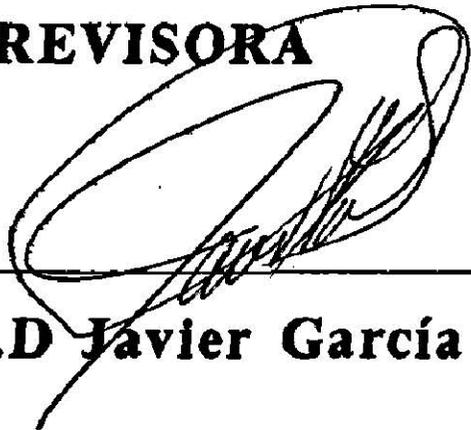
TESIS QUE PRESENTA

FERNANDO CAVAZOS RODRIGUEZ

PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

COMISION REVISORA

ASESOR PRINCIPAL



Ph.D. Javier García Cantú

DEDICATORIA

A DIOS:

Señor no tengo palabras para expresarte todo lo que siento, por haberme dado la oportunidad de llegar a esta nueva etapa en mi vida, porque siempre que te necesite tu estabas conmigo, me llevaste de la mano durante todos mis estudios, y cuando alguna vez tropecé, ahí estabas tu para levantarme, me diste fortaleza para afrontar las dificultades, sabiduría para tomar decisiones correctas, paciencia para seguir adelante y fe en mi mismo para llegar hasta donde eh llegado; me diste unos padres que me han apoyado y me han dado todo su amor, a mis hermanos con los que cuento para todo, a lo largo de mis estudios me diste excelentes maestros y muy buenos amigos. Pero sobre todo Señor, Gracias porque cuento contigo.

A mis Padres:

José Cavazos Ramos

Ma. Antonieta Rodríguez de Cavazos

Por ser tan buenos padres, por haberme apoyado en todos mis estudios y darme su amor.

A mis hermanos:

Ing. José Gpe. Cavazos Rodríguez

Ma. Antonieta Cavazos Rodríguez

Alejandro Cavazos Rodríguez

A toda mi familia y a mis amigos que me han apoyado siempre en todo.

AGRADECIMIENTOS

Al Ph.D Javier García Cantú.

Por su valiosa asesoría en este trabajo y por brindarme su amistad.

Al Ing. José Francisco Uresti Salazar.

Por su cooperación en este trabajo, y por brindarme su amistad.

A todo el personal del laboratorio de bromatología de la FAUANL, por su valiosa cooperación.

A todo el personal del Campo Experimental Zootécnica de la FAUANL por el apoyo y cooperación en este trabajo.

Al Ph.D Emilio Olivarez Saenz

Por su valiosa asesoría en la elaboración de este trabajo.

Al M.Sc. Felipe Cardenas

Por su valiosa ayuda en la revisión de este trabajo.

Al Ing. Jose Luis Martinez

Por su ayuda en la revisión de este trabajo.

A todos mis compañeros con los que conviví durante mi carrera.

A la Facultad de Agronomía por la formación profesional que me brindó.

Al Ing. Luis Pedraza

Por la colaboración en la impresión de este trabajo.

A todos mis amigos que siempre me han apoyado.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
LITERATURA REVISADA	3
Anatomía y fisiología del aparato reproductor del verraco.	3
Historia de la inseminación artificial.	12
Colección de semen.	14
Características del semen de cerdo.	18
Semen fresco.	24
Semen refrigerado.	24
Semen congelado.	25
Diluyentes para semen (fresco y congelado)	28
Diluyente SOFY.	30
Saliva artificial de McDougall.	30
Bioxido de carbono (CO ₂)	30
Mucilago de nopal (<i>Opuntia spp.</i>).	31
Azucares	32
Yema de huevo	33
Glicerol	34
Experiments citados por algunos autores	36
MATERIALES Y METODOS	45
RESULTADOS Y DISCUSIONES	54
CONCLUSIONES	65
RESUMEN	67
BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
1	Composición del semen de verraco.	23
2	Efecto de dilución antes y después de la incubación en la morfología del acrosoma y motilidad después de choque frío a 5°C por 10 minutos.	36
3	Efecto del volumen de pellets en la morfología del acrosoma y motilidad, en semen congelado de verraco.	36
4	Efecto del tipo de azúcar y concentración de azúcar en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	37
5	Efecto de la concentración de glucosa y el método de descongelado en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	37
6	Relación entre tipo de polyol, concentración de polyol, y el método de descongelado en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	38
7	Interacción entre la temperatura de desconge-	

	lado y el método de descongelado en el porcentaje de espermatozoides móviles después de descongelado.	38
8	Efecto de la concentración de bajo peso molecular de polyol (LMWP) en el diluyente en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	39
9	Interacción entre el método de dilución y la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides móviles después de descongelado.	39
10	Efecto del tiempo de almacenaje del semen diluido a 5°C antes del congelado y de la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	40
11	Efecto del método de dilución y de la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	40
12	El efecto en el porcentaje postdescongelado de espermatozoides móviles usando seis agentes crioprotectores en tres concentraciones.	41

13	Efecto en el porcentaje de espermatozoide móviles	PAGINA
TABLA	de congelado y descongelado en presencia de seis combinaciones con tres concentraciones.	41
14	El efecto en el porcentaje de descongelado de espermatozoides móviles en tres métodos de dilución y cinco concentraciones de acetamidas.	42
15	El efecto del método y concentración de eritritol en el porcentaje de espermatozoides móviles postdescongelado.	42
16	Efecto del tiempo de inmersión en baño maría a 52°C en el postdescongelado en la motilidad del semen congelado de verraco en maxi - pajillas.	43
17	Motilidad, morfología del acrosoma y capacidad de fertilización de semen de verraco congelado, heteroespérmico y homoespérmico.	43
18	Efecto de la concentración de glicerol y xilitol en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado.	44
19	Concentración de datos del ensayo # 1, donde se	

	probaron 3 tiempos y 4 velocidades de centrifugación.	55
20	ANVA para los valores concentrados en la tabla 19.	55
21	Motilidades promedio para el factor tiempo de la tabla 20, ensayo 1.	56
22	Motilidades promedio para el factor velocidad de la tabla 20, ensayo 1.	56
23	Motilidades promedio de la interacción entre tiempo y velocidad de la tabla 20, ensayo 1.	56
24	Comparación de medias de motilidades para la variable bloques (lecturas a través del tiempo), ensayo 1.	57
25	Concentración de datos del ensayo # 2 que consistió en probar 3 niveles de yema de huevo y 3 niveles de glicerol.	59
26	ANVA para los datos concentrados en la tabla 25.	59

TABLA		PAGINA
27	Motilidades promedio para los 3 niveles de yema de huevo, ensayo 2.	60
28	Motilidades promedio para los tres niveles de glicerol, ensayo 2.	60
29	Motilidades promedio para la interacción entre la yema de huevo y el glicerol de la tabla 26, ensayo 2.	60
30	Comparación de motilidades promedio para el factor yema de huevo de la tabla 26, ensayo 2.	61
31	Comparación de motilidades promedio para el factor glicerol de la tabla 26, ensayo 2.	61
32	Comparación de motilidades promedio para la interacción entre yema de huevo y glicerol de la tabla 26, ensayo 2.	61
33	Concentración de datos del ensayo # 3, en donde la motilidad post-descongelado fue transformada a angulos Bliss.	62
34	ANVA para los datos concentrados en la tabla 33,	

TABLA		PAGINA
	ensayo 3.	62
35	Motilidades promedio para el factor yema de huevo de la tabla 34, ensayo 3.	62
36	Motilidades promedio para el factor glicerol de la tabla 34, ensayo 3.	63
37	Motilidades promedio para la interacción de yema de huevo - glicerol de la tabla 34, ensayo 3.	63
38	Comparación de motilidades promedio para el factor yema de huevo de la tabla 34, ensayo 3.	63
39	Comparación de motilidades promedio para el factor glicerol de la tabla 34, ensayo 3.	64
40	Comparación de promedios de motilidad de la interacción de los factores yema de huevo y glicerol de la tabla 34, ensayo 3.	64

INTRODUCCION

Investigaciones recientes han reportado exitos en la inseminación artificial de cerdas usando semen fresco, sin embargo, en contraste con la abundante información referente al congelamiento de semen bovino, relativamente poca información esta disponible sobre la criopreservación de semen de verraco. La mayoría de los investigadores han fallado en obtener aceptables tasas de fertilidad, obteniendo resultados muy modestos e inconsistentes cuando inseminaron con semen post-descongelado. La necesidad de una eficiente y conveniente utilización de semen porcino es indiscutible. El mejoramiento de los parámetros productivos solo podran lograrse usando sementales de comprobada eficiencia y de alto potencial genético. Es bien conocido, que la inseminación artificial de cerdas bajo las condiciones actuales de manejo repercute en bajas tasas de fertilidad y disminución del tamaño de la camada. La técnica quirurgica de inseminación artificial por medio de laparotomía-laparoscopia parece ser que dan fertilidades más alentadoras sin embargo, el uso de estas técnicas tienen sus limitaciones restringidas principalmente al area de investigación. Para aplicación práctica, es incuestionable las ventajas que ofrece el congelamiento de semen, sin embargo hasta la fecha no se ha logrado preservar el semen de porcino sin que el descongelado del mismo afecte significativamente la motilidad y la integridad acrosomática.

El objetivo de este trabajo es probar el efecto del lavado de semen, dilución en SOFY (saliva - opuntia -

fructosa - yema de huevo), glicerolización y congelado en la motilidad medida después del descongelado.

LITERATURA REVISADA

ANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL VERRACO.

Los testículos en el verraco son muy grandes y su contorno es regularmente elíptico. Están colocados de modo que su eje mayor está dirigido hacia arriba y atrás, siendo el borde libre superficial y hallándose la cola del epidídimo en la parte más alta. (Sisson, 1974).

Segun Schuarze (1972) en el cerdo los testículos presentan una posición oblicua, por lo que el extremo de la cabeza se dirige craneoventralmente y el borde del epidídimo craneodorsalmente.

Las dos funciones principales de los testículos son producir los espermatozoides, las células germinales masculinas, y secretar andrógenos o sea las hormonas sexuales masculinas.

La mayor parte del testículo está compuesto por tubos seminíferos, que son los que producen los espermatozoides, y por las células intersticiales, que se encuentran dispersas entre los tubos y su función es secretar testosterona (Sorensen, 1979).

El mediastino testicular es un cordón axial de tejido fibroelástico, del que irradian tabiques interlobulares (Sisson, 1974).

La trama formada por el mediastino confiere al testículo su estructura y su forma característica, ya que mantiene fijos en su lugar a los tubos seminíferos, células intersticiales y rete testis.

Dentro de los testículos, las unidades productoras de espermatozoides son los tubos seminíferos. Estos integran la mayor parte de la masa testicular y reciben sus nutrientes por medio de la gran cantidad de vasos sanguíneos que atraviesan los séptulos del testículo interno. Los tubos son muy largos, enrollados y de dimensiones microscópicas (Sorensen, 1979).

Los espermatozoides pasan de los tubos seminíferos hacia una trama de tubos colectores denominada rete testis. Estas estructuras se localizan en el mediastino y recogen la esperma a medida que ésta pasa por los tubos seminíferos. Los tubos están revestidos con epitelio cuboidal o escamoso simple y actúan como pasaje hacia los conductos eferentes. En el verraco, muchas de esas células tienen burbujas de secreción en la superficie. El fluido contribuye al transporte de los espermatozoides (Sorensen, 1979).

Los espermatozoides pasan enseguida hacia los conductos eferentes, estos los reciben inmaduros provenientes de la rete testis y los llevan sobre la superficie del testículo, hasta el epidídimo. Estos conductos están revestidos por un epitelio cuboidal o columnar ciliado. Los cilios de estas células son móviles. Por lo tanto, impulsan activamente a los espermatozoides a través de los conductos. Además de las células ciliadas, existen células secretoras que presentan gránulos de tamaño considerable. Estas producen un líquido que ayuda en el transporte de los espermatozoides hacia la cabeza del epidídimo. Se considera aproximadamente que son 15 tubos o conductos (Sorensen, 1979).

Sisson (1974) menciona que son 7 u 8 conductos eferentes que van al epidídimo y que parten de la rete testis. Por otra parte Schwarze (1972) dice que son de 14 a 21 conductos o tubos eferentes en el cerdo.

El epidídimo cumple cinco funciones principales: primero, sirve como lugar de maduración para los espermatozoides, los cuales están todavía inmaduros al llegara la cabeza de la estructura. Segundo, actúa como un pasaje espermático que comunica a los conductos eferentes con el conducto deferente. Tercero, concentra la esperma pues al paso de éste se absorbe una parte del líquido. Cuarto, sirve como área de almacenamiento. La principal zona de acumulación es la cola, situada sobre la superficie ventral. Los espermatozoides ahí concentrados están maduros y listos para cumplir su función natural. Quinto, produce enzimas que digieren los espermatozoides no eyaculados (Sorensen, 1979).

Segun Sisson (1974) el epidídimo está intimamente unido al testículo, su cola es muy voluminosa y forma una proyección cónica obtusa en la extremidad posterior del testículo.

El epidídimo está situado, en el cerdo, en el borde craneodorsal. El conducto del epidídimo tiene de 17 a 18 m estirado (Schwarze, 1970).

Los conductos deferentes, son muy largos, reciben los espermatozoides concentrados provenientes de la cola del epidídimo y los transportan hacia el colículo seminal. Forman parte del cordón espermático y luego penetran hacia la cavidad abdominal, donde se revisten con un pliegue del peritoneo. Sus

paredes musculares efectúan contracciones peristálticas que se inician en la cola del epidídimo y se desplazan con rapidez hasta la uretra, impulsando un chorro de semen hacia ésta y luego al exterior. Envolviendo a los testículos se encuentra el escroto que es una cubierta protectora de piel gruesa y pilosa (Sorensen, 1979).

El escroto está situado a corta distancia del ano y no se halla tan marcadamente definido de las porciones circundantes como en otros animales (Sisson, 1974).

La elasticidad del escroto del cerdo no es mucha, pero mantiene una temperatura dentro del testículo menor a la corporal, necesaria para la espermatogénesis (De Alba, 1985).

Debajo de la piel se encuentra la túnica dartos, de naturaleza músculo-elástica, y se puede considerar como verdadera bolsa testicular (Schwarze, 1970).

Esta se contrae cuando hace frío para arrugar el escroto y acercar los testículos al cuerpo, con lo cual los entibia; por el contrario, se relaja cuando hace calor y así permite que los testículos penden lejos de la temperatura abdominal. El músculo cremáster es continuación de la musculatura abdominal y se fija en las tunicas vaginal y parietal. Su función es elevar los testículos y, junto con el dartos, ayuda a mantener una temperatura testicular constante (Sorensen, 1979).

El cremáster externo está bien desarrollado y se extiende hasta cerca del centro de la porción escrotal de la túnica (Sisson, 1974).

En el epididimo se encuentra situada la base del cordón espermático, que es una formación aplanada, más o menos cónica (Schwarze, 1970).

El cordón pasa a través de los anillos inguinales superficiales por los musculos abdominales oblicuos externos y penetra en la cavidad abdominal a través del anillo inguinal profundo, integrado por varios músculos (Sorenen, 1979).

El cordón espermático es necesariamente muy largo de 20 a 25 cm en un verraco de talla media (Sisson, 1974).

Existe una red de vasos sanguíneos llamada plexo pampiniforme que se localiza en el cordón espermático, entre el testículo y el anillo inguinal superficial. La vena testicular está muy espiralada en esta región y forma una estructura reticular alrededor de la arteria testicular. La sangre fría de la red venosa disminuye la temperatura de la sangre arterial que ingresa y, de ese modo contribuye a mantener el mecanismo termorregulador de los testículos, junto con los músculos dartos y cremáster (Sorensen, 1979).

Existen vesículas seminales que son extraordinariamente voluminosas y que se extienden en el interior de la cavidad abdominal. Son masas piramidales, con tres caras, y están en aposición entre sí en la línea media, cubriendo la parte posterior de la vejiga y uréteres (Sisson, 1974).

Schwarze (1970) dice que la longitud de las vesículas seminales es de 7 - 12 cm.

Segun Sorensen (1979) las dimensiones de las vesículas son de 14 por 6 cm y contribuyen del 10 al 30 % con la

secreción vesicular al eyaculado del verraco. El sitio donde se mezclan la esperma y los líquidos accesorios recibe el nombre de colículo seminal. La esperma y los líquidos accesorios ya mezclados reciben el nombre de semen.

El colículo seminal se hincha durante la excitación sexual y la eyaculación, lo que cierra el orificio del ureter y evita que la orina se mezcle con el semen. Este pasa a la uretra y sigue ese tubo continuo, en el que desembocan otras glándulas accesorias, a lo largo del pene hasta el exterior (Sorensen, 1979).

La prostata secreta un líquido resbaloso que limpia y lubrica la uretra a la vez que aumenta ligeramente el volumen de semen, lo cual puede verse como una gota de líquido transparente que escurre del glande poco antes del coito (Sorensen, 1979).

La prostata consta de dos partes. El cuerpo mide aproximadamente 2.5 cm de anchura y cubre el cuello de la vejiga y la uretra en su punto de unión. Está a su vez oculta por las vesículas seminales (Sisson, 1974).

Segun Schwarze (1970) la próstata del cerdo es pequeña y está constituida por un cuerpo plano, en forma de broche, situado en el comienzo de la uretra.

La función de las glándulas bulbouretrales son muy similares a las de la próstata: limpiar y lubricar la uretra, e incorporar un pequeño volumen de líquido al semen.

Las glándulas bulbouretrales en el verraco son grandes y tienen forma semejante a un cigarro; se localizan a los lados

de la superficie dorsal de la uretra y miden 12 x 3 cm. Estas glandulas aportan una considerable cantidad de líquido al eyaculado por el verraco, el cual tiene un volumen 20 veces mayor que el del toro (Sorensen, 1979). Schwarze (1970) difiere en lo anterior, diciendo que la longitud de las glandulas bulbouretrales en el verraco es de 17 a 18 cm y 5 cm de grosor. Por otra parte Sisson (1974) está de acuerdo con Sorensen (1979) diciendo que la longitud de dichas glandulas es de 12 cm y 2.5 a 3 cm de anchura.

En lo que se refiere al pene, la raíz de este se localiza en la región del músculo bulboesponjoso. El tejido conectivo forma tres áreas esponjosas: una que envuelve a la uretra (el bulbo de pene) y otras dos laterales (la crura penis). La crura se junta por debajo del músculo bulboesponjoso para formar el cuerpo cavernoso del pene, que está recubierto por una capa muy resistente de tejido conectivo blanco, la túnica albugínea. El ensanchamiento del cuerpo cavernoso durante la excitación sexual, provoca rigidez peneana con lo que se facilita la introducción en el momento de la cópula. Este congestionamiento es el resultado de la obstrucción del flujo venoso del pene por los músculos isquiocavernosos que encierran a las dos flexuras sigmoides y crean una acción de bombeo en la base del miembro. El semen es impulsado a gran velocidad a través de la uretra mediante la contracción del músculo bulboesponjoso, seguido por una oleada de contracciones de la uretra provocadas por la sangre encerrada en el cuerpo cavernoso. Conforme disminuye la excitación, el

flujo venoso se restablece y la presión se normaliza. El verraco tiene pene fibroelástico con flexura sigmoide. La peneana se localiza en posición craneal en referencia al escroto (Sorensen, 1979).

Segun Sisson (1974) el pene del verraco se asemeja en general al del buey. Sin embargo la flexura sigmoidea es preescrotal. La parte anterior no presenta glande, pero está retorcida en espiral, especialmente en la erección. El pene del verraco mide de 40 a 50 cm de longitud.

Segun Schwarze (1970) el cuerpo del pene es largo, delgado y resistente y está provisto de escaso tejido cavernoso. La flexura sigmoidea se localiza hacia el ombligo con respecto al escroto. La punta del pene es fina y enroscadas ligeramente en forma helicoidal.

El cuerpo del pene continua entre las piernas pasando por los cordones espermáticos y forma la porción libre peneana, cuya porción terminal, de consistencia mas blanda, se denomina glande. En la base del segmento libre del pene se encuentra fijo el prepucio, que envuelve relajado y lo cubre parcialmente después de la protursión. Por lo regular el glande queda dentro del prepucio para protegerse.

La porción libre del pene del verraco tiene una forma muy característica, ya que se trata de una estructura blanda, enrollada cuando esta en relajamiento, y que no se distingue con facilidad del cuerpo del pene. Después de la erección, se adquiere la apariencia de un sacacorchos o tirabuzón al ponerse turgente. El glande, que es la parte mas distal,

penetra el cuello uterino de la marrana y se mueve en forma rotatoria durante la cópula. Hasta donde se sabe es el único animal doméstico en el que hay penetración del cuello uterino durante el coito (Sorensen, 1979).

El prepucio está formado por una capa externa de piel recubierta por pelos y una parte interna que envuelve la parte libre del pene. El prepucio se convierte en una cubierta para una parte del cuerpo del pene después de la erección y extensión lo que protege a este último durante el coito.

El verraco posee glándulas prepuciales muy activas y un divertículo en esa misma zona. En el mismo se acumulan, detritos celulares y líquido prepucial, lo que confieren al animal su olor característico. Dicha exhalación es, según parece, atrayente para las cerdas en estro, pero es muy picante y penetra los tejidos del verraco haciendo desagradable su carne (Sorensen, 1979).

Sugun Schwarze (1970) en el prepucio del verraco el divertículo puede alcanzar un tamaño aproximado al huevo de una gallina.

HISTORIA DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL DEL CERDO

El desenvolvimiento histórico de la inseminación artificial en cerdos, comprende tres periodos: El primero toma origen en las iniciales experiencias sobre inseminación artificial porcina llevadas a cabo por Ivanov, en Rusia, en los años de 1931-1932, citado por Perez (1966), utilizando métodos rudimentarios de obtención de esperma (esponja peniana), seguidos de nuevos intentos de inseminación artificial del cerdo, realizados por Lipatov, Rodin y Kamisarov, citados por Perez (1966), que dieron como resultados la introducción del maniquí para la recolección del esperma en el cerdo, hasta el descubrimiento de la vagina artificial llevado a cabo poco después en Rusia y en la misma época, por McKenzie, en los E.E.U.U.

Un segundo período comenzaría en el año de 1938, en el que el profesor Bonadonna, Albodanza y otros colaboradores italianos establecen la vagina artificial como método de recolección espermática perfectamente adaptado a la fisiología eyaculatoria del cerdo. No obstante, este gran avance de la inseminación artificial que como técnica de reproducción animal había resuelto el problema de recolección espermática, mediante el método para fisiológico ciertamente eficaz, sin embargo, se encontraba con un gran problema planteado por la dificultad de conservación *in vitro* del propio eyaculado, así como con grandes dificultades en cuanto a soluciones diluyentes de perfecto comportamiento biológico en relación a los espermatozoides del cerdo, por otra parte muy sensibles a

tal efecto. Estas razones fueron responsables de un verdadero colapso en la difusión de la inseminación artificial en la especie porcina, a pesar de las exigencias que en consecuencia venia demandando la extensión de las modernas explotaciones industriales.

El tercer periodo en el desenvolvimiento histórico de la inseminación artificial porcina toma su origen en los años 1955-56. Corresponde a los ingleses Polge y Rowson, así como a Glover y Madden, el mérito de haber sentado los fundamentos sobre los cuales habría de difundirse sin límites la inseminación artificial en las explotaciones porcinas de todo el mundo. En consecuencia, se analizaron distintos métodos para la dilución y conservación del esperma a base de: citrato, yema de huevo, leche descremada, antibióticos, etc., intentandose, por otra parte, la congelación del esperma que habría de permitir la conservación a largo plazo del material fecundante del verraco.

Tras el planteamiento con éxito de estos aspectos biológicos que limitaban la utilidad práctica y económica de la inseminación artificial en la especie porcina, surge evidentemente una verdadera etapa de expansión prometedora de la inseminación artificial en las industrias de producción porcina.

COLECCION DE SEMEN

Los procedimientos para lograr una adecuada colección de semen son muy variables y todo depende de la respuesta del verraco a cada uno de los procedimientos. Sorensen (1979) describe un número de formas o procedimientos para colectar semen: recuperación, masaje, condon, inserción vaginal, fistula uretral, mano enguantada, vagina artificial y electroeyaculación. El método de recuperación después de un servicio natural puede ser logrado por aspiración desde el útero, usando para tal caso una sonda conectada a una jeringa. El semen colectado por este método siempre estará contaminado con bacterias y secreciones uterinas, cervicales y vaginales. En 1914 un profesor italiano (Amantea) de la Universidad de Roma desarrolló una vagina artificial para ser usada con perros, posteriormente, se desarrolló una vagina artificial específica para cerdos. En la actualidad se ha incluido en las vaginas artificiales para verracos un dispositivo que varía la tensión con la ayuda de una bola de hule, la cual sirve para subir aire en movimientos crecientes y decrecientes los cuales semejan las contracciones naturales de la vagina de la cerda, para lo cual los verracos son muy sensitivos y estimulan la eyaculación. Sin embargo, si una vagina artificial específica para cerdos no es posible de obtener puede usarse una para toro haciendole ciertas adaptaciones, tales como acortando su longitud. Tambien puede usarse una manguera de radiador con un tubo de latex.

El método de la mano enguantada es el más utilizado

actualmente, y se utiliza un guante de goma (Hamcock y Howell, 1959) citados por Rillo (1982), tiene la ventaja de simplificación, disminución de costos de material, suprimiendo la necesidad de limpieza y esterilización.

Finalmente tiene la ventaja de evitar las reacciones de inhibición de los verracos causadas en particular por las variaciones de temperatura que se producen en la vagina artificial y que hacen rehusar la subida al maniquí a algunos machos, así como la producción de eyaculados incompletos por estímulos inhibitorios.

El operador se coloca a la derecha del maniquí o cerda en celo y cuando asoma el extremo del pene, lo coge fuertemente del tirabuzón siguiendo sus movimientos anteroposteriores sin forzarlo y en el momento en que este se encuentra totalmente erecto, se tracciona dando comienzo la eyaculación. Para excitar mejor al verraco se puede hacer pequeñas contracciones con la mano.

El extremo del pene se coge con el pulgar por la base y parte posterior del tirabuzón, mientras con los dedos índice y medio se siguen los surcos que lo rodean quedando la palma de la mano en la parte superior en ocasiones, los movimientos rotatorios no permiten asir el pene con facilidad y si el verraco comienza a eyacular, aunque la posición de la mano no sea correcta, se debe mantener esta forma a pesar de no ser la óptima, puesto que durante la eyaculación no debe cambiarse la posición de la mano, ya que si el verraco no siente bien fijada la extremidad del pene se excitaría nuevamente con

espermatozoides deberá colectarse para propósitos de
inseminación artificial.

CARACTERISTICAS DEL SEMEN DE CERDO

Un estudio detallado del semen de cerdo fue reportado por Mckenzie (Anderson, 1945). El semen de un cerdo normal es de un color grisáceo a blanco lechoso dependiendo de la concentración de espermatozoides; entre mas alta es la concentración de espermatozoides es mas blanquecino el color del semen. El semen fresco no tiene olor, al menos que se contamine con orina o con el contenido del divertículo prepucial. Esta bolsa contiene orina en descomposición y residuos celulares, los cuales tienen un olor desagradable (es el olor sexual característico del cerdo). Del 60 a 75 % del semen es líquido y ligeramente viscoso con una gravedad específica de 1.01 a 1.02. Un eyaculado normal contiene además de la porción líquida, porciones de hojuelas de material gelatinoso las cuales tienen apariencia de pastillas. En un eyaculado fresco este material asemeja una cadena de pastillas de 3 a 5 mm. de diámetro, con la superficie plana unida, a medida que el semen está expuesto al medio ambiente, estos cuerpos gelatinosos absorben líquido, lo que provoca que se ensanchen y se precipiten al fondo formando una masa solida de material gelatinoso. Después de enfriado por 24 horas o más, puede absorber tanta cantidad de liquido del semen que puede comprender del 50 al 75 % del peso total. Esta masa tiene un color gris opaco con una gravedad específica de 1.03 a 1.04. Es posible encontrar espermatozoides en el material gelatinoso, los cuales son atrapados al amalgamarse después de la eyaculación.

Algo de material gelatinoso se produce durante todo el periodo de eyaculación pero este varía, en apariencia y cantidad dependiendo de la etapa de eyaculación. En los primeros minutos el eyaculado es descolorido tal vez por la presencia de orina; el material gelatinoso presente en esta etapa presenta una masa uniforme con la consistencia viscosa de un lubricante. La mayor cantidad de material gelatinoso típico aparece al final o inmediatamente después de la fracción del eyaculado que contiene la más alta concentración de espermatozoides. Al final o inmediatamente después de la expulsión de la fracción rica en espermatozoides, el semental expulsa casi por completo material gelatinoso.

Un semental puede presentar uno, dos o más ondas de eyaculación ricas en espermatozoides, generalmente dos. Después de cada onda aparece un fluido claro de poca viscosidad que contiene muy pocos o casi ningún espermatozoide con una gravedad específica de 1.01 o menos.

El volumen del eyaculado varía de 125 a 500 ml. siendo lo más común de 200 ml. Milovanov (1936) obtuvo volúmenes desde 150 a 400 ml.

Las vesículas seminales, glándulas de Cowper, próstata, glándulas uretrales y el epidídimo contribuyen con 15 a 20 % 10 a 25 %, 55 a 75 % y 2 a 5 % del volumen del semen total respectivamente. La fracción, parte gelatinosa a parte líquida es generalmente constante promediando cerca de 70 % de líquido de una eyaculación. El número de espermatozoides por mm^3 varía de 0.1 a 0.5 x 10^9 por mm^3 . El número de espermatozoides por

eyaculado puede alcanzar hasta 30×10^{10} , sin embargo el promedio total es alrededor de 8.5×10^{10} (concentración promedio de 0.3×10^9 por mm^3).

Debido a la configuración anatómica de los cuernos y útero de la cerda, y el número de ovulos liberados, grandes cantidades de semen son necesarias para lograr una adecuada fertilización, el volumen recomendado varía entre 50 a 100 ml. de semen fresco libre del material gelatinoso, estos volúmenes son para concentraciones de espermatozoos razonablemente altas.

La morfología del espermatozoide de un verraco puede variar, y nos dara una indicación de su fertilidad. Mckenzie y Phillips (1937) describieron varios tipos de anomalías: colas enrolladas, porción media agrandada, porción media acamada, las cuales describieron en ese orden como las más comunes en eyaculación de cerdo. Rodolfo (1934) describe tres tipos de anomalías referentes a la gota citoplasmática de los espermatozoides; aquellos que no tienen gota citoplasmática, los que presentan gota citoplasmática sobre el cuello, y aquellos con gota citoplasmática hacia la parte media de la cola. Se creía que estos tres tipos representaban diferentes estados en el desarrollo del espermatozoide. Phillips (1935) concluye que la morfología espermática de un verraco fértil no deberá tener más del 20 % de formas anormales, de 20 a 50 % de anomalías producen problemas de fertilidad tales como: camadas pequeñas o verracos que fallan en preñar las cerdas. Por otra parte, Milovanov (1936) reporta que verracos fértiles no deben tener mas del 30 % de forma

anormales en el esperma de su eyaculado. Atención especial deberá prestarse a los cambios en la integridad del acrosoma, ya que el acrosoma tiene un papel muy importante en la fertilización. Los cambios del acrosoma están más correlacionados con la fertilidad que la motilidad del esperma. El acrosoma puede ser dañado durante la dilución, el enfriamiento, almacenamiento, congelamiento y descongelamiento del semen (Salamon et. al., 1973). El daño más severo ocurre en los cambios de temperatura ascendentes como el descongelado y el calentamiento a 37°C cuando se usa semen fresco. De acuerdo con McKenzie et. al., (1934) un eyaculado de verraco puede ser diluido en tres o en cinco fases, dependiendo si ocurre una o dos ondas de alta concentración espermática en la eyaculación; la primera o fase preespermática comprende de 1 a 5 minutos, consiste principalmente de orina, material semisólido, no contiene espermatozoides y comprende del 5 al 20 % del eyaculado. La segunda o fase espermática dura de 2 a 5 minutos y consiste en un líquido blanco lechoso y algo de material gelatinoso, esta fracción contiene la mayor parte del esperma y comprende del 40 al 60 % del volumen total eyaculado. Cuando hay dos ondas de eyaculación, la segunda y la tercera fase se repiten pero el volumen del semen y la concentración espermática son mucho más bajos en la segunda repetición de la segunda fase que en la primera repetición de la segunda fase. La segunda onda es mucho más pronunciada en unos verracos que en otros, mientras que en algunos animales esta completamente ausente; la segunda y subsecuentes

repeticiones de la segunda fase tienden a desaparecer con sucesivas eyaculaciones. Usualmente la tasa de eyaculación comienza a incrementarse a partir del tercer minuto, alcanza su pico máximo entre el cuarto y el quinto minuto y se disminuye después del sexto minuto por dos a tres minutos, para ser seguido por una segunda elevación cerca del final de la eyaculación. Entonces, hay una onda inicial de máximo pico y una segunda de un pico menos pronunciado. La duración de la eyaculación varía grandemente entre verracos, y no existe una aparente relación entre la duración y la frecuencia de la eyaculación, se han encontrado diferencias tales como 4.5 minutos en la duración para el eyaculado de un semental hasta 16 minutos en otro. Tampoco podemos establecer una relación entre la duración del eyaculado y el volumen obtenido.

El pH del eyaculado fue estudiado por Rodolfo (1934), existe una gran variación entre las diferentes fracciones de un eyaculado en cuanto a su pH; la primera fracción puede alcanzar un pH de 8.4 a 9, este alto nivel de pH se debe principalmente a la alta concentración de orina que puede presentarse al inicio de la eyaculación. El fluido de las glandulas accesorias que aparece después de la orina limpia el conducto uretral de orina y otros contaminantes. Durante un coito normal este material es desechado antes de que el pene penetre la vulva, el pH del total de semen colectado no debe exeder de 7.9, los valores mas usuales obtenidos de muestras limpias son alrededor de 7.3.

TABLA 1. Composición del semen de verraco (según White, 1958)
citado por Smidt y Ellendorff, 1972.

PROPIEDAD O COMPONENTE	UNIDAD	VALOR MEDIO	LIMITE DE DISPERSION
Volumen del eyaculado	ml	250	150 - 500
Espermatozoides	X 10 ⁹ /ml	0.100	0.025 - 0.3
Descenso crioscópico	°C	0.62	0.59 - 0.63
Conductibilidad	mho X 10 ⁻⁴	129	125 - 135
pH		7.5	7.3 - 7.9
Agua	g/100 ml	95	94 - 98
CO ₂	ml/100 ml	50	
Na	mg/100 ml	660	290 - 850
K	mg/100 ml	260	90 - 410
Ca	mg/100 ml	4	2 - 6
Mg	mg/100 ml	11	5 - 15
Cl	mg/100 ml	330	
P	mg/100 ml	66	150 - 430
N	mg/100 ml	615	335 - 765
Fructosa	mg/100 ml	12	2 - 25
Acido cítrico	mg/100 ml	140	30 - 330

SEMEN FRESCO

Es el que se utiliza a nivel de explotación porcina y, que después de su obtención, puede conservarse a temperatura ambiente durante dos a tres horas y aplicarlo a cuatro o cinco hembras repartiendo aproximadamente unos 50 ml. de esperma a cada una.

SEMEN REFRIGERADO

Si queremos conservar el semen más de 2 a 3 horas hay que tener en cuenta que la composición del plasma que se ha unido a los espermatozoides durante la eyaculación tiene como finalidad estimular el metabolismo celular para conseguir el máximo de actividad durante el transporte espermático y por último en el momento de la fecundación.

Se debe añadir al esperma un medio que equilibre la acción de las sustancias del plasma seminal, manteniendo las células en condiciones de inactividad metabólica tal a la que se encontraban en el epidídimo para poder recuperar posteriormente esta actividad en el momento de la inseminación; simultáneamente, es preciso también disminuir la temperatura como coadyuvante en el mantenimiento del estado de anabiosis.

El semen refrigerado se conserva a dos temperaturas: 5°C y 15°C.

El semen conservado a 5°C necesita el aporte de sustancias crioprotectoras, siendo las más utilizadas la yema de huevo y la leche.

El ritmo de descenso de temperatura a 5°C debe ser muy

lento para evitar el choque térmico antes de que los fosfolípidos de la yema de huevo recubran la membrana celular, llevando a cabo su efecto crioprotector.

La temperatura mas utilizada en casi todos los países es la de 15°C. Tambien al igual que el anterior descenso este debe ser muy lento y una vez llegada la temperatura a 15°C se debe mantener.

SEMEN CONGELADO

Durante la década de los cincuenta aparecen los intentos de Polge (1956), Hoffman (1959) y Hess y colaboradores (1967), citados por Rillo (1982), y aunque los resultados fuesen esperanzadores ya que las células descongeladas manifestaban motilidad, no se conseguía fertilidad.

Durante la década del 60 al 70 Graham (1962), Bader (1964), Iida (1966), King y Mc Person (1967), etc. citados por Rillo (1982), continúan las investigaciones; pero no es hasta 1970 que Polge, Salamon y Wilmut (citados por Rillo), consiguen fecundar cerdas por vía quirúrgica a través del oviducto, obteniendo una tasa de fecundación del 83 % cuando las inseminaciones se hacían proximas al momento de la ovulación.

A partir de entonces varios investigadores consiguan poner a punto técnicas para la aplicación por vía cervical: Graham (1971), Vicente (1971), Crabo e Einarsson (1971), Pursel y Johnson (1971), etc. (citados por Rillo 1982).

Los resultados de fertilidad que se obtienen oscilan entre el 50 y el 75 % en el caso de espermatozoides de verraco con

buena capacidad de congelación, aunque en la práctica son muy pocos los animales selectos que cumplen este requisito.

En la técnica de congelación se siguen los siguientes pasos:

1.- Equilibración inicial

El plasma seminal contiene lipoproteínas que pueden ser aprovechadas en la protección de la membrana celular, por este motivo diversas técnicas conservan la fracción rica durante un tiempo que oscila entre una o dos horas después de la obtención del semen.

2.- Centrifugación

El plasma seminal se elimina por tener una fuerza iónica muy elevada y por lo tanto de efectos negativos en la conservación.

3.- Concentración

Las dosis deben tener como mínimo 6×10^9 espermatozoides. La concentración idónea según diversos autores oscila alrededor de los 600 000 espermatozoides por mm^3 .

4.- Los más utilizados son el BF's de Pursel citado por Rillo (1982), y los que contienen lactosa o glucosa con yema de huevo.

5.- Tiempo de equilibrio

Debe ser como mínimo de tres horas después de la dilución para dar tiempo a la protección celular.

6.- Velocidad de enfriamiento

Al principio debe ser lenta, pero una vez protegida la célula se puede acelerar hasta los 5°C . La congelación debe ser semirápida a través de hielo carbónico o vapores de

nitrógeno líquido.

7.- Modelado y envases en la congelación

Hay dos métodos clásicos, pajillas y píldoras o pellets. Las pajillas han sido muy utilizadas por los autores alemanes y están dando muy buenos resultados en Bélgica. Pero la mayor parte de los investigadores usan la técnica de Nagase y Niwa que consiste en la preparación de pellets entre 0.1 y 0.25 cc., sobre un molde de hielo carbónico.

8.- Descongelación

El semen congelado en pajillas según la técnica de Westendorf citado por Rillo (1982), se descongela de la siguiente manera, inmediatamente después de sacar la pajilla del tanque de nitrógeno líquido, la colocamos sobre agua caliente a 50°C hasta que aumente la temperatura del semen alrededor de los 30°C. En el caso de las pajillas que se utilizan en esta técnica, con volumen de 6 cc. de semen necesitan 40 segundos de inmersión en el agua para la descongelación.

Después de esta operación se añade el contenido de la pajilla en un diluyente a 37°C, con un volumen de 50 cc.

Una de las formas para descongelar los pellets es la técnica de Pursel (1976), y sigue los siguientes pasos:

- Introducir los pellets durante tres minutos en una caja de poliespan.
- Dilución en el medio BTS (Pursel y Johnson, 1975), siete veces el volumen de la dosis a 42°C.
- Utilización inmediata.

Algunos diluyentes para semen de cerdo son:

Hülseberg VIII (Richter et al., 1975)

5.75 g Glucosa

0.25 g Lactosa

0.45 g Citrato trisodico dihidratado

0.35 g Disodio EDTA

0.12 g Bicarbonato de sodio

0.04 g Cloruro de potasio por litro

100 ml Agua bidestilada

BFs (Pursel y Johnson, 1975)

1.2 g N-Tris-(Hidroximetil) metil-2 aminometano Ac. sulfonico

0.2 g Tris (Hidroximetil) aminometano

3.2 g Glucosa

0.5 ml Pasta orvus

20 ml Yema de huevo

100 ml Agua bidestilada

BTS (Pursel y Johnson, 1975)

3.7 g Glucosa

0.6 g Citrato trisodico dihidratado

0.125 g Disodio EDTA

0.075 g Cloruro de potasio

100 ml Agua bidestilada

BL1 (Pursel y Johnson, 1976)

2.9 g Glucosa

1.0 % Citrato de sodio
0.2 % Bicarbonato de sodio
0.03 % Cloruro de potasio
0.01 % Sulfato de dihidroestreptomina
1000 U.I/ml Penicilina K

BF3 (Pursel y Johanson, 1971)

4 % Lactosa
2 % Caseina
2 % Tris
1 % Acido citrico
0.5 % Fructosa
0.1 % Estreptomina
1000 U.I/ml Penicilina K

Graham, E.F (1971)

3 % Solución de citrato de sodio
70 partes de yema de huevo
7-9 % Solución de leche en polvo
2.1 g NaHCO_3
42.9 g Glucosa
1000 ml Agua bidestilada

DILUYENTE SOFY

Este diluyente consta de saliva artificial de McDougall, (McDougall. 1947), como solución buffer, Mucilago de nopal (*Opuntia spp.*), que se considera como fuente de algunos azúcares tales como arabinosa, galactosa y xilosa entre otros. Contiene también fructosa como fuente energética y yema de huevo como protección y fuente de alimento.

SALIVA ARTIFICIAL DE McDOUGALL.

La saliva fue encontrada por determinaciones potenciométricas para tener un pH de 8.23 debido a la gran cantidad de bicarbonato presente. La concentración de ion hidrógeno puede ser calculada indirectamente en dicha solución del contenido total de CO₂ y la presión parcial del CO₂, proporcionando la composición de la solución conocida.

El objetivo de la saliva artificial es el de contrarrestar los cambios de pH que sufre el semen debido al metabolismo de los espermatozoides; del mismo modo que lo hace en el rumen con las secreciones ácidas del metabolismo de las bacterias.

BIOXIDO DE CARBONO (CO₂)

Vandemark y Sharma (1957), citado por García, 1986 desarrollaron un diluyente para incrementar el uso de inseminación artificial en áreas donde no se dispone de refrigerador, este diluyente fue llamado I.V.T. (Illinois, variable, temperatura). La característica sobresaliente de este diluyente de semen es que incluye CO₂ como un inhibidor reversible del metabolismo del esperma. La incorporación del

gas al diluyente se hace a temperatura ambiente, burbujeando el gas de CO₂ hasta que el pH se reduce hasta 6.35. Sin embargo, con anterioridad el concepto del gas como inhibidor del metabolismo del esperma fue establecido por Shettles (1939). García (1986) usó el CO₂ para estabilizar el pH del SOF (Saliva - Opuntia - Fructosa) hasta lograr un pH de 7. El reportó sobrevivencia de espermatozoides de caprino por 21 días usando este diluyente. Peterson y Norolound (1958) reportaron sobrevivencia de espermatozoides por 15 días después de exponer la dilución a 150 atmosferas de N₂ a 6°C. Foote (1976), reportó el diluyente "Cornell University" (CUE) con aire en la fase gaseosa fue igual en la sobrevivencia observada en la presencia de CO₂ o N₂.

MUCILAGO DE NOPAL (*Opuntia spp.*)

Fue incluido en el diluyente SOF por García (1986). La producción de mucilago está caracterizada como un fenómeno común en el Reino vegetal y aparece en todos los grupos de plantas. Sin embargo, la producción de mucilago es característica de la Familia Cactaceae. La adaptación a la sequía de la opuntia ha sido atribuido al reciclaje de carbon a través del CAM (metabolismo ácido de las crassulaceae). Y no a la función del mucilago en el calcio y la economía del agua de la planta. Sin embargo, puede contribuir hacia la resistencia al congelamiento y el cicatrizado de las lesiones de las plantas como ha sido sugerido para los arabinogalactanes (Clark, et al., 1979).

García (1986), reporta que el mucilago de *Opuntia ficus*

indica contiene: arabinosa 24.6 % , galactosa 40.1 % , ácido galacturónico 10 % , ramnosa 13.1 % y xilosa 22.2 % . El mucilago purificado tiene un alto peso molecular (46×10^6), es un polielectrolito negativamente cargado, el cual tiene una alta viscosidad en el agua, y una baja viscosidad en amortiguadores a pH de 7.4. La viscosidad se incrementa a medida que el pH se incrementa en la región ácida, el pico de viscosidad se obtiene a pH de 7. En presencia de iones de calcio la viscosidad permanece constante entre un pH de 2 a 8 (Trachtenberger y Mayer, 1982).

AZUCARES

La adición de azúcar ha sido usado como un ingrediente en los diluyentes de semen de los animales domésticos. La adición de glucosa a los diluyentes para semen de bovino a resultado en un mejoramiento de su motilidad después del descongelado. Martin y Emmens (1961), reportaron un incremento de la fertilidad al incrementar el tiempo de equilibrio en muestras que contenían 1.25 % de fructosa. Sin embargo, Martin y Emmens (1958) habían reportado que 1.25 % (v/v) arabinosa y fructosa añadido al diluyente no produjeron mejores tasas en la concepción. Nagase y Graham (1964), estudiaron diluyentes que tenían 20 % de yema de huevo, 4.7 % de glicerol y 75.3 % de una solución de azúcares. Seis diferentes combinaciones de azúcares en solución fueron comparadas, no encontrándose, diferencias en fertilidad debido a la composición de la solución de azúcar.

La fructosa es rápidamente metabolizada por el

espermatozoide (Mann, 1948), sin embargo, otros azúcares no penetran la membrana del plasma. Probablemente cualquier efecto benéfico de tales azúcares es el resultado de sus propiedades crioprotectoras. Nagase et al., (1968) reportaron el efecto protector de los azúcares en contra del congelado y descongelado de los espermatozoides de toro sobre todo cuando este se congela en pastillas. Salamon et al., (1973) experimentaron con azúcares como ingrediente del diluyente de verraco (arabinosa, xilosa, manosa, glucosa, lactosa, sucrosa, y rafinosa). Diferentes combinaciones de azúcares fueron utilizadas con diferentes concentraciones de glicerol. La mejor recuperación del espermatozoide de cerdo después de congelado y descongelado se logró con glucosa a una concentración de 315 mM en diluyentes que contenían 22.5 % de yema de huevo y 7.5 % de glicerol. Por otra parte Wilmut y Polge (1977), reportaron que en la ausencia de glicerol, la máxima motilidad fue obtenida con fructosa pero casi ninguna con glucosa. En contraste, cuando el diluyente contiene glicerol la máxima motilidad se logró con diluyentes que contenían glucosa, alguna motilidad se obtuvo con diluyentes que contenían glicina pero casi ninguna con diluyentes que contenían fructosa. Lo anterior nos sugiere que existe una interacción entre el tipo de azúcar y el glicerol.

YEMA DE HUEVO

La yema de huevo actúa como una fuente que proporciona nutrientes y se ha visto que también le sirve de protección al espermatozoide cuando este se congela. La yema de huevo debe

separarse bien de sus otros componentes, ya que estos son deletéreos para los espermatozoides.

GLICEROL

El descubrimiento de que el glicerol puede proporcionar considerable protección a los espermatozoides durante el congelamiento y descongelamiento fue descubierto hace 40 años, Polge et al., (1949), logró estos descubrimientos cuando estudiaba la preservación de semen de gallo a bajas temperaturas. Esta acción protectora del glicerol ha sido explotada en congelamiento y descongelamiento de semen de toro. Desafortunadamente, no ha sido posible desarrollar métodos exitosos cuando se trabaja con esperma de varraco. Una gran dificultad que ha sido difícil de superar cuando se congela semen de cerdo, está relacionada con una marcada discrepancia entre motilidad y la capacidad de fertilización de los espermatozoides que han sido congelados y descongelados en la presencia de glicerol. La máxima motilidad obtenida con semen de cerdo congelado y posteriormente descongelado se ha obtenido en presencia de 4 a 6 % de glicerol. Sin embargo, si tal semen es depositado dentro del útero via cervix, la fertilización obtenida es desalentadora. Por otra parte, cuando el semen de verraco es congelado y descongelado en la ausencia de glicerol o en la presencia de proporciones muy reducidas (1-2 % de glicerol) la motilidad después del descongelado es reducida, pero la capacidad de fertilización se incrementa a niveles aceptables. Altos niveles de glicerol (4-6 %) en el diluyente produzcan un incremento en la

proporción de espermatozoides con daños acrosomáticos después del congelado y descongelado y, consecuentemente, el vaciado de enzimas intracelulares también se incrementará (Graham et al., 1972).

EXPRIMENTOS CITADOS POR ALGUNOS AUTORES

TABLA 2. Efecto de dilución antes y después de la incubación en la morfología del acrosoma y motilidad después del choque frío a 5°C por 10 minutos. (Pursel, et al., 1973).

(Experimento 2)^a

Dilución ^b	Horas de incubación antes del choque frío					
	1	3	5	1	3	5
	--X NAR acrosomas--			----X motilidad----		
A 1:2	29.4 ^c	59.1	82.1	22.5	51.2	78.8
B 1:6	20.4	39.7	54.4	15.9	23.1	48.8
C 1:2-1:6 ^d	23.7	55.5	61.2	16.5	40.0	52.5
D 1:10	23.1	36.7	50.3	11.6	23.8	41.9
E 1:2-1:10 ^e	23.1	51.9	66.4	12.2	35.0	55.6

^a El coeficiente de variación fue de 10.75 % para NAR y de 12.88 % para motilidad.

^b El promedio de la concentración de semen por ml. fue de 278×10^6 para 1:2, 93×10^6 para 1:6 y 56×10^6 para 1:10.

^c Valor medio para ocho repeticiones.

^d La dilución fue 1:2 durante la incubación y 1:6 durante el choque frío.

^e La dilución fue 1:2 durante la incubación y 1:10 durante el choque frío.

Tabla 3. Efecto del volumen de pellets en la morfología de acrosoma y motilidad, en semen congelado de verraco. (Pursel y Johnson., 1973).

Volumen del pellet en ml. ^a	% de acrosomas NAR ^b	% de motilidad ^b
.09	65 \pm 3.7	43 \pm 3.1
.18	64 \pm 3.8	49 \pm 3.4
.27	64 \pm 3.9	53 \pm 3.3

^a Pellets (3×10^9 esperma) mantenidos en una caja de poliuretano por 3 min. y después se añade una solución descongeladora de 12.5 ml. a 50°C.

^b Media \pm D.S para dos eyaculados.

Tabla 4. Efecto del tipo de azúcar y concentración de azúcar en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. (Salamon, et al., 1972).

Tipo de azúcar en el diluyente	Nombre del azúcar	Concentración de azúcar en el diluyente (mM)			Medias
		105	210	315	
Monosacáridos	Arabinosa	1.3	8.0	8.3	5.3
	Xilosa	0.2	8.3	15.9	6.3
	Manosa	5.1	9.6	17.9	10.2
	Glucosa	6.1	21.3	29.7	17.8
Disacaridos	Lactosa	15.0	19.9	5.1	12.6
	Sucrosa	17.9	15.0	2.9	10.8
Trisacaridos	Rafinosa	16.2	10.9	0.0	6.1
Control	Glicina	10.1	25.0	22.4	18.6
Medias		7.5	14.3	10.2	10.5

Tabla 5. Efecto de la concentración de glucosa y el método de descongelado en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. (Salamon, et al., 1973).

Método de descongelado*	Concentración de glucosa en el diluyente (mM).				Medias
	210	315	420	525	
Prueba de tubos en seco	17.9	19.2	6.4	0.57	9.0
En solución de glucosa 210 (mM)*	4.3	6.4	5.1	2.3	4.4
En solución de glucosa 280 (mM)*	12.8	16.1	11.3	7.9	11.9
En solución de glucosa 350 (mM)*	13.2	16.1	13.2	7.9	12.5
Medias	11.5	14.0	8.7	3.9	9.1

* Temperatura de descongelado 37°C.

* Dilución descongeladora 1:2 (pellets:solución v/v).

Tabla 6. Relación entre tipo de polyol, concentración ([]) de polyol, y el método de descongelado en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. (Salamon, et al., 1973).

Tipo de polyol en el diluyente	Método de descongelado*	[] de polyol en el diluyente				\bar{x}
		100	180	260	340	
Inositol	En tubos secos	20.8	27.6	19.8	8.4	18.6
	En solución descongelada*	9.6	14.3	16.7	13.9	13.5
Dulcitol	En tubos secos	19.7	23.7	30.2	24.3	24.4
	En solución descongelada*	8.4	12.6	10.7	11.8	10.8
\bar{x}		14.1	19.1	18.9	14.2	16.5

Tabla 7. Interacción entre la temperatura de descongelado y el método de descongelado en el porcentaje de espermatozoides móviles después de descongelado. (Salamon, et al., 1973).

Método de descongelado	Temp. de descongelado °C			\bar{x}
	60	50	37	
En tubos secos	22.6	22.2	19.5	21.4
En solución descongeladora*	11.2	17.8	8.2	12.1

* Dilución descongeladora 1:2 (pellets:solución descongeladora, v/v).

Tabla 8. Efecto de la concentración de bajo peso molecular de polyol (LMWP) en el diluyente en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. (Salamon, et al., 1973).

Tipo de diluyente*	Concentración de LMWP en el diluyente(M)				\bar{x}
	0.25	0.50	0.75	1.00	
Glucosa-yema de huevo	25.3	29.1	30.7	27.2	28.1
Inositol-yema de huevo	14.2	18.8	26.6	30.2	22.1
\bar{x}	19.5	23.8	28.6	28.7	25.0

* No contiene glicerol.

Tabla 9. Interacción entre el método de dilución y la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides móviles después de descongelado. (Wilmot. et al., 1973).

Método de dilución	Concentración de glicerol (% v/v)			Medias
	2.0	4.0	8.0	
(i) Una etapa	(67)*25.5	(67) 24.0	(62) 21.9	23.8
(ii) Dos etapas	(58) 25.0	(62) 29.1	(58) 26.5	26.9
(iii)	(63) 23.0	(62) 25.0	(52) 26.5	24.8
Medias	24.5	26.0	24.9	24.8

* Los valores que estan dentro del parentesis son los porcentajes de motilidad pre-congelado.

Tabla 10. Efecto del tiempo de almacenaje del semen diluido a 5°C antes del congelado y de la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. (Wilmot, et al., 1973).

Concentración de glicerol (% v/v)*	Tiempo de almacenaje a 5°C*			Medias
	30s	5 min	50 min	
4	29.7	30.2	29.7	29.8
6	30.2	27.6	28.1	28.6
8	26.0	21.9	20.8	22.9
10	20.5	17.0	17.6	18.3
12	17.0	12.6	16.7	15.4
Medias	24.5	21.5	22.3	22.7

* En semen diluido 1:2

*Después de adicionar el glicerol a parte del diluyente a 5°C; se refrigera la parte del semen diluida (1:1) de 30 a 5°C en 2.5 hr.

Tabla 11. Efecto del método de dilución y de la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. (Wilmot, et al., 1973).

Método de dilución	Concentración de glicerol (% v/v)*			Medias
	2.0	4.0	8.0	
1 Una etapa	19.8	29.1	20.8	23.1
2	17.4	24.5	29.1	23.5
3	9.0	11.8	15.7	12.0
4 Dos etapas	7.9	8.9	13.1	9.9
5	5.9	7.9	11.3	8.3
Medias	11.5	15.5	17.6	14.8

* En semen diluido 1:3.

Tabla 12. El efecto en el porcentaje postdescongelado de espermatozoides móviles usando seis agentes crioprotectores en tres concentraciones^a. (Wilmot y Polge, 1977).

Agentes	Concentración en el semen diluido (M)			Medias
	0.25	0.50	1.00	
Glicerol	10.8	25.2	18.2	17.7
Eritritol	17.5	25.2	11.3	17.6
Etileno glicol	5.8	3.8	1.1	3.3
Dietileno glicol	7.5	8.2	5.9	5.9
Propileno glicol	5.3	8.9	4.8	4.8
DMSO	15.8	17.0	5.8	12.3
Medias	10.0	13.5	5.5	

^a El porcentaje postdescongelado de espermatozoides móviles de control = 4.9.

Tabla 13. Efecto en el porcentaje de espermatozoides móviles de congelado y descongelado en presencia de seis combinaciones con tres concentraciones^a. (Wilmot y Polge, 1977).

Agente	Concentración en la dilución de semen (M)			Medias
	0.25	0.50	1.00	
Glicerol	14.3	24.4	19.5	19.2
Acetamida	13.8	18.7	29.4	20.3
Metil pirrolidona	1.1	0	0	1.2
Dimetil acetamida	1.1	0	0.4	2.7
Dimetil formamida	3.8	0	0	3.7
Tetrametil urea	0.9	0.2	0	3.0
Medias	4.6	2.8	3.3	

^a El porcentaje de espermatozoides móviles de control = 5.8.

Tabla 14. El efecto en el porcentaje de descongelado de espermatozoides móviles en tres métodos de dilución y cinco concentraciones de acetamidas. (Wilmut y Polge, 1977).

Concentración de acetamida (M)	Método de dilución			Medias
	1	2	3	
0.00	3.6	5.5	3.2	4.0
0.25	6.6	7.2	5.4	6.4
0.50	9.4	9.4	6.6	8.4
1.00	23.8	8.2	3.8	10.7
2.00	1.8	6.4	6.0	4.5
Medias	7.7	7.3	4.9	

Tabla 15. El efecto del método de dilución y concentración de eritritol en el porcentaje de espermatozoides móviles postdescongelado. (Wilmut y Polge, 1977).

Concentración de eritritol (M)	Método de dilución			Medias
	1	2	3	
0.00	12.1	4.9	5.0	7.1
0.25	18.9	7.8	5.1	9.9
0.50	21.6	7.6	6.6	11.3
1.00	17.1	8.1	3.2	8.8
Medias	17.3	7.1	4.9	

Tabla 16. Efecto del tiempo de inmersión en baño maría a 52°C en el post-descongelado en la motilidad del semen congelado de verraco en maxi-pajillas. (Pursel y Park, 1987).

Tiempo de inmersión (seg.)	Motilidad (%)	
	0.5 h ^a	2 h ^a
28	25	21
34	31	25
40	37	30
46	29	24
52	23	21
58	22	18

^a Tiempo de evaluado el semen después del descongelado.

Tabla 17. Motilidad, morfología del acrosoma y capacidad de fertilización de semen de verraco congelado, heteroespérmico y homoespérmico. (Pursel y Johnson, 1975).

Concepto	Heteroespérmico	Homoespérmico
Cerdas inseminadas	13	13
Cerda con huevos fertilizados	11 (85%)	11 (85%)
Huevos recuperados ^b	125	122
Huevo fertilizados normales ^b	104 (85%)	109 (89%)
Huevos fertilizados anormales ^b	4 (3%)	2 (2%)
Huevos no fertilizados ^b	16 (13%)	11 (9%)
Morfología del acrosoma ^c		
NAR (% ± SE)	73 ± 1.9	71 ± 2.0
Motilidad del espermatozoide ^c (% ± SE)	51 ± 3.2	42 ± 3.5

^a Dos inseminaciones de 6×10^9 espermatozoides

^b De cerdas con huevos fertilizados

^c Evaluación post-descongelado

Tabla 18. Efecto de la concentración de glicerol y de xilitol en el porcentaje de espermatozoides móviles después del descongelado. Diluyente: yema de huevo - inositol 180 mM. (Salamon, et al., 1973).

Concentración de glicerol en el diluyente (% V/V)	Concentración de xilitol en el diluyente (M)						Medias
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	
0	0.0	14.9	17.4	21.6	20.6	1.8	9.8
3.75 (2.5)*	26.5	23.0	25.0	24.5	23.5	12.5	22.3
7.50 (5.0)*	29.7	28.1	21.6	16.5	6.4	0.0	13.9
Medias	13.2	21.7	21.2	20.8	16.0	2.7	15.0

* Concentración de semen diluido 1:2

MATERIALES Y METODOS

Las pruebas de laboratorio se iniciaron el mes de septiembre de 1989 y se concluyeron el mes de diciembre del mismo año.

El trabajo se llevó a cabo en el Campo Experimental de Zootécnia de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., ubicado en Marín N.L., en las instalaciones porcinas y en uno de los laboratorios con los que cuenta dicha Facultad.

Para la realización de este trabajo, se tuvo que probar a varios sementales, para ver cual era el más manejable y el que montara el maniquí sin cohibirse ante la presencia de los técnicos para proceder a la extracción. Primeramente se intentó la extracción con la monta de un semental a una hembra en celo, utilizando el método de la mano enguantada, pero se tuvo el problema que la hembra en la mayoría de las ocasiones no aguantaba por mucho tiempo el peso del semental, y el semental retraía el pene al momento de sujetarselo. Posteriormente se intentó por el mismo método la extracción, solo que en lugar de una cerda en celo, se utilizó un maniquí impregnado con la orina de una cerda en celo, para estimular la monta del macho; se probaron varios sementales, y se escogió al que tenía mas libido y no se coibía ante la presencia de los operarios a realizar la extracción. Al intentar la extracción de semen por el método de la mano enguantada, nunca se tuvo éxito, ya que cuando se sujetaba el pene con la mano, éste lo retraía impidiendo así la extracción, en las múltiples ocasiones en que se intentó

extraer por este método, esto es debido a que el verraco no estaba entrenado para este tipo de extracción. Posteriormente al ver el fracaso que se obtuvo con el método anteriormente citado, optamos por utilizar el método de la vagina artificial, que consiste en un tubo de caucho que en su interior lleva una funda de latex; en el tubo de caucho existe un orificio por donde se le agrega agua entre 37 y 39°C y presión por medio de una pera insuflar que va conectada en dicho orificio después de agregar el agua. Por un extremo de la vagina artificial se aplica jalea lubricante y por el otro lado se le coloca una funda cónica para después recolectar el semen en un recipiente. Una vez que monta el semental al maniquí y desenfunda el pene, este se sujeta y se desvía hacia un lado para introducirlo dentro de la vagina artificial y se espera el momento en que empieza la eyaculación; se elimina la primera fracción ya que es pobre en espermatozoides, y se colecta la segunda fracción, que es de color blanco lechoso y rica en espermatozoides, y la tercer fracción que tiene apariencia de pequeñas pastillas de consistencia gelatinosa que unidos forman una masa consistente, es capturada con una capa de gasas que se le colocan al termo recolector. Una vez terminada la eyaculación se quitan las gasas del termo y se tapa perfectamente bien, llevandolo inmediatamente al laboratorio para procesarlo. Fue así como se obtuvo el primer eyaculado de buena calidad para poder ser procesado.

La fracción de semen recolectada en el termo es llevada de inmediato al laboratorio en donde se va a procesar.

Posteriormente se analiza el semen en el microscopio para checar la motilidad y la concentración de espermatozoides en la fracción recolectada.

Se usaron dos diluyentes, uno para lavar el semen, esto significa que se agrega una parte de diluyente por una de semen, se centrifuga y se decanta con el fin de que los espermatozoides se precipiten y eliminar el liquido seminal. El otro se utiliza propiamente para congelar.

La composición del diluyente para lavar el semen fue el SOF (García, 1986).

80 % de saliva artificial de McDouglas.

20 % de mucilago de nopal (*Opuntia spp.*).

2.5 gr. de fructosa / 100 ml. de diluyente.

1000 U.I de penicilina sodica / ml. de diluyente.

1 mg. de estreptomocina / ml. de diluyente.

La saliva artificial de McDouglas modificada por García (1986), se elabora de la siguiente manera:

En un litro de agua destilada se disuelven:

9.80 gr. de NaHCO_3 (Bicarbonato de sodio)

7.00 gr. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de sodio)

0.57 gr. de KCl (Cloruro de potasio)

0.47 gr. de NaCl (Cloruro de sodio)

0.12 gr. de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de magnesio)

El mucilago de nopal se extrae de la siguiente manera: se corta una penca de nopal y se le quitan las espinas y la corteza, luego se corta la pulpa en trozos y se coloca en un vaso con agua destilada y se pone a hervir durante unos

minutos, luego se filtra perfectamente bien usando un papel filtro del número 41 y se obtiene el mucilago.

El diluyente para congelar consta de dos fracciones, A y

B :

La fracción A contiene:

- * yema de huevo
- * saliva artificial
- * mucilago de nopal
- penicilina 1000 U.I / ml. de diluyente
- estreptomicina 1 mg. / ml de diluyente
- fructosa 2.5 gr. / 100 ml. de diluyente

La fracción B contiene:

- * yema de huevo
- * saliva artificial
- * mucilago de nopal
- penicilina 1000 U.I / ml. de diluyente
- estreptomicina 1 mg. / ml. de diluyente
- fructosa 2.5 gr. / 100 ml. de diluyente
- * glicerol

NOTA: Los componentes marcados con * varían su concentración dependiendo del tratamiento de que se trate.

El método que se siguió para la congelación de semen consiste de los siguientes pasos:

1.- El semen al ser llevado al laboratorio posteriormente de la extracción, es analizado chequeando la motilidad y la concentración.

2.- Posteriormente se procede a lavar el semen, se coloca el

semen en tubos de ensaye y por cada parte de semen se agrega una parte del diluyente anteriormente descrito. Se colocan los tubos en una centrifuga con capacidad de ocho tubos de 15 ml. cada uno y que mide las revoluciones por minuto (R.P.M) de 500 en 500 hasta 6000 R.P.M. (sin control de presión y de temperatura). El tiempo que duran los tubos en la centrifugación es de 4 minutos por 2000 R.P.M.. El fin de esto es concentrar a los espermatozoides en la parte inferior del tubo y separarlos del plasma seminal.

3.- El plasma seminal mezclado con parte del diluyente para lavar son eliminados de los tubos de ensaye por decantación.

4.- Inmediatamente se agrega el diluyente para congelar, y de ese diluyente primero se agrega la fracción A, que es la que no contiene glicerol, de esta parte se le agregan 2.5 ml. a cada tubo.

5.- Se colocan los tubos en el cuarto frio o refrigerador, éstos van protegidos por un recipiente térmico rodeado de agua, con el fin de evitar el choque térmico.

6.- Una vez que las muestras estan a 5°C se les va agregando la fracción B del diluyente para congelar, que contiene diferentes niveles de glicerol dependiendo del tratamiento que se trate. La fracción B se agraga a intervalos de diez minutos. Cuatro fracciones de 0.625 ml se agregaron en treinta minutos, procediendo a agitarse en cada ocacion, con el fin de que el glicerol proteja bien a las células.

7.- Inmediatamente se procede al congelamiento, y para esto se siguen los siguientes pasos:

a) Se toma una barra de hielo seco (CO₂) que tiene una temperatura de -79°C y se le hacen depresiones con alguna varilla calentada de la punta.

b) Se toma una muestra del semen que se encuentra en el tubo con una pipeta Pasteur y se colocan en las depresiones anteriormente hechas.

c) Se deja el semen por espacio de diez minutos hasta que se formen perfectamente bien los pellets, y posteriormente se guardan en nitrógeno líquido.

8.- La descongelación, se efectúa de la siguiente manera:

a) Se agrega 1 ml. del diluyente que se usó para congelar, de la parte A en un tubo de ensaye y se mantiene en agua a 39°C.

b) Se sacan los pellets del hielo seco o del nitrógeno líquido y se dejan sobre una superficie limpia durante 3 minutos.

c) Posteriormente se colocan los pellets en el tubo que contiene la fracción A a 39°C, agitando durante 3 minutos.

d) Se procede a cuantificar la motilidad del semen post-descongelado en el microscopio.

Dentro de este trabajo, fueron realizados tres ensayos que a continuación se describen:

ENSAYO 1

Con el propósito de determinar la velocidad (RPM) y tiempo de centrifugación se probaron 4 velocidades en 3 tiempos de centrifugación. Los tratamientos se arreglaron en un diseño factorial dentro de un modelo de bloques al azar. (Steel y Torrie, 1960).

Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + A_j + B_k + (AB)_{jk} + E_{ijk}$$

$i = 1 \dots r$

$j = 1 \dots a$

$k = 1 \dots b$

Donde:

Y_{ijk} = La i -ésima observación sujeta al j -ésimo nivel de A y al k -ésimo nivel de B.

μ = Efecto verdadero de la media poblacional.

β_i = El efecto de la i -ésima repetición (tiempo de observación).

A_j = El efecto del j -ésimo tiempo de centrifugación.

B_k = El efecto de la k -ésima velocidad de centrifugación.

$(AB)_{jk}$ = Efecto de la interacción.

E_{ijk} = Efecto del error experimental.

La diferencia entre los promedios tanto de los factores, como de sus interacciones se cuantificaron usando la prueba de diferencia mínima significativa (D.M.S.).

ENSAYO 2

Con el propósito de determinar cual es el mejor nivel de yema de huevo en el diluyente para congelar semen, así como el nivel óptimo de glicerol, se arreglaron los tratamientos en un factorial de un diseño completamente al azar. (Steel y Torrie, 1960).

Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

$i = 1 \dots a$

$j = 1 \dots b$

$$k = 1 \dots r$$

Donde:

Y_{ijk} = La i -ésima observación sujeta al j -ésimo nivel de A y al k -ésimo nivel de B.

μ = Efecto verdadero de la media poblacional.

A_i = El efecto del i -ésimo nivel de yema de huevo.

B_j = El efecto del j -ésimo nivel de glicerol.

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción.

E_{ijk} = Efecto del error experimental.

La diferencia entre los promedios tanto de los factores, como de sus interacciones se midieron usando la prueba de diferencia mínima significativa (D.M.S.).

ENSAYO 3

Este fue el último ensayo realizado en el experimento, consistió en reducir el rango de los niveles del ensayo anterior, tanto de la yema de huevo como los del glicerol. Se planteo como en el ensayo 2, un arreglo factorial a tratamientos, bajo un diseño completamente al azar. (Steel y Torrie, 1960).

Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

$$i = 1 \dots a$$

$$j = 1 \dots b$$

$$k = 1 \dots r$$

Donde:

Y_{ijk} = La i -ésima observación sujeta al j -ésimo nivel de A y al k -ésimo nivel de B.

μ = Efecto verdadero de la media poblacional.

A_i = Efecto del i -ésimo nivel de yema de huevo.

B_j = Efecto del j -ésimo nivel de glicerol.

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción.

E_{ijk} = Efecto del error experimental.

La diferencia entre los promedios tanto de los factores, como de las interacciones entre los factores se evaluaron usando la prueba de diferencia mínima significativa (D.M.S.).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados del ensayo # 1 que consistió en probar 3 tiempos de centrifugación (2, 4 y 6 minutos) y 4 velocidades de centrifugación (1000, 2000, 3000 y 4000 rpm), se presentan a continuación:

En este ensayo solo se obtuvo diferencia altamente significativa para repeticiones (perdida de motilidad através del tiempo), como lo muestra la tabla # 20, y en la tabla # 24 se muestra la comparación de medias para repeticiones. En este ensayo se obtuvieron las mayores sobrevivencias de espermatozoides mantenidos a temperatura ambiente utilizando diluyente SOF (saliva, Opuntia y fructosa) para lavar el semen y SOFY (saliva, Opuntia, fructosa y yema de huevo) para conservarlo, cuando se utilizaron 2000 rpm durante 4 minutos. Estos resultados no concuerdan con Pursel y Johnson (1975) quienes utilizaron 300 g durante 10 min. Por otra parte Bamba y Cran (1988) utilizaron 350 g durante 15 min. Pursel y Johnson (1971) utilizaron 1500 rpm durante 10 min., posteriormente en 1972 utilizaron 10000 rpm durante 10 min., Pursel y Park (1987) utilizaron 300 g por 10 min.

Los resultados del estudio para congelación de esperma porcino diluido en (SOFY) se presentan a continuación, (ensayo 2):

En este ensayo se probaron 3 niveles de yema de huevo (10, 15 y 20 %) y 3 niveles de glicerol (2, 4 y 6 %). La concentración de datos de este ensayo se puede observar en la tabla # 25.

Tabla 19. Concentración de datos del ensayo # 1, donde se probaron 3 tiempos y 4 velocidades de centrifugación.

A	B	L1	L2	L3	L4
2	1000	71.56	63.43	63.43	50.76
2	2000	71.56	63.43	63.43	60.76
2	3000	63.43	63.43	60.00	50.76
2	4000	71.56	67.21	67.21	60.00
4	1000	56.78	67.21	67.21	60.00
4	2000	71.56	56.78	67.21	53.72
4	3000	71.56	67.21	71.56	53.72
4	4000	63.43	67.21	71.56	53.72
6	1000	71.56	67.21	67.21	53.72
6	2000	71.56	67.21	67.21	56.78
6	3000	71.56	63.43	67.21	60.00
6	4000	71.56	60.00	67.21	53.72

A Tiempo en minutos

B Velocidad de centrifugación en rpm.

L1,L2,L3,L4. Lecturas tomadas a intervalos de 6 hr., donde se expresa la motilidad en angulos Bliss.

Tabla 20. ANVA para los datos concentrados en la tabla 19.

F.V	GL	SC	CM	F	P>F
Repeticiones	3	1398.70	466.23	33.17	0.00
Tiempo	2	38.77	19.38	1.37	0.26
Velocidad	3	10.66	3.55	0.25	0.86
Interacción	6	140.78	23.46	1.67	0.16
Error	33	463.83	14.06		
Total	47	2052.73			

C.V = 5.88 %

Tabla 21. Motilidades promedio para el factor tiempo de la tabla 20, ensayo 1.

Tiempo en minutos	Medias
2	62.62
4	63.78
6	64.82

Tabla 22. Motilidades promedio para el factor velocidad de la tabla 20, ensayo 1.

Velocidad en rpm.	Medias
1000	63.34
2000	63.43
3000	63.66
4000	64.53

Tabla 23. Motilidades promedio de la interacción entre tiempo y velocidad de la tabla 20, ensayo 1.

Tiempo en min.	Velocidad en rpm.				Medias
	1000	2000	3000	4000	
2	62.30	62.30	59.41	66.50	62.62
4	62.80	62.32	66.01	63.98	63.78
6	64.93	65.69	65.55	63.12	64.82
Media	63.34	63.43	63.66	64.53	63.74

Tabla 24. Comparación de medias de motilidades para la variable bloques (lecturas a través del tiempo), ensayo 1.

Bloques	Media
6 hr	68.97 A
12 hr	66.70 AB
18 hr	64.48 B
24 hr	54.81 C

Nivel de significancia = 0.05

DMS = 3.11

En este ensayo se encontro que las mayores motilidades post-descongelado (40%) fueron para el diluyente que contenia 15 % de yema de huevo y 2 % de glicerol (tabla 23). Los diluyentes con 10, 15 y 20 % de yema de huevo rindieron motilidades post-descongelado de 12.20, 23.19 y 10.72 %, respectivamente. Los diluyentes con 2, 4 y 6 % de glicerol rindieron motilidades post-descongelado de 31.67, 8.42 y 8.77 %, respectivamente. Los resultados obtenidos en este ensayo no concuerdan con los reportados por Wilmut et. al., (1973) quienes reportan motilidades post-descongelado de 9.8, 22.3 y 13.9 % para 0, 3.75 y 7.50 % de glicerol, respectivamente (tabla 18). Podemos observar sin embargo, que la mayor motilidad se obtuvo con el menor nivel de glicerol (3,75 %) como ocurrio en este ensayo (2 %). Con relación a los niveles de yema de huevo Wilmut et. al., (1973) obtuvieron motilidades post-descongelado de 16.3 % cuando usaron 15 % de yema de huevo en comparación de 11 % de esperma motil cuando el diluyente no contenia yema de huevo. Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los obtenidos en esta prueba donde se

usó 15 % de yema de huevo y se obtuvo una motilidad de 23.19 %. Wilmut et. al., (1973) probaron 2, 4 y 8 % de glicerol (tabla 9) en diluyentes que contenían yema de huevo e inositol, obteniendo motilidades de 24.5, 26.0 y 24.9 % respectivamente. No observando diferencias significativas entre los niveles de glicerol probados. En este ensayo se observaron motilidades ligeramente superiores 31.67 % para 2 % de glicerol, las cuales fueron diferentes ($P < .05$) a las motilidades obtenidas con 4 % (8.77 %) y 6 % (8.42 %) de glicerol.

En el ensayo # 3 se trató de comprobar los resultados del ensayo # 2, con la variante de que solo se probaron 2 niveles de yema de huevo (10 y 15 %) y se redujo el rango de glicerol (2, 3 y 4 %). La concentración de datos del ensayo # 3 se puede observar en la tabla 33.

En este ensayo los diluyentes con 10 y 15 % de yema de huevo rindieron motilidades post-descongelado de 8.31 y 29.07 %, respectivamente. Los diluyentes con 2, 3 y 4 % de glicerol rindieron motilidades post-descongelado de 29.63, 17.47 y 26.74 %, respectivamente.

Se encontraron mayores motilidades post-descongelado (50 %) en el diluyente con 15 % de yema de huevo y 2 % de glicerol. Estos resultados concuerdan con el anterior ensayo, con respecto a que la mayor motilidad post-descongelado en los ensayo 2 y 3 se obtuvo utilizando 15 % de yema de huevo y 2 % de glicerol.

Tabla 25. Concentración de datos del ensayo # 2 que consistió en probar 3 niveles de yema de huevo y 3 niveles de glicerol; la motilidad post-descongelado fue transformada a angulos Bliss. (Steel y Torrie, 1960)

A	B	I	II	III	IV
10	2	33.21	31.94	36.27	30.00
	4	12.92	18.43	12.92	18.43
	6	12.92	15.34	9.97	12.92
15	2	39.23	36.27	39.23	40.97
	4	24.35	26.56	22.78	25.10
	6	24.35	22.78	21.13	22.78
20	2	31.30	33.21	30.00	29.33
	4	9.97	8.13	9.97	12.92
	6	20.26	18.43	12.92	12.92

A = Niveles de yema de huevo en %

B = Niveles de glicerol en %

I, II, III Y IV son el número de la repetición

Tabla 26. ANVA para los datos concentrados en la tabla 25.

F.V	GL	SC	CM	F	P>F
Yema de huevo	2	661.13	330.56	58.28	0.00
Glicerol	2	2366.55	1183.28	208.62	0.00
Interacción	4	109.68	27.42	4.83	0.01
Error	27	153.14	5.67		
Total	35	3290.51			

C.V = 10.45 %

Tabla 27. Motilidades promedio para los tres niveles de yema de huevo, ensayo 2.

% de yema de huevo	Medias
10	20.44
15	28.79
20	19.11

Tabla 28. Motilidades promedio para los tres niveles de glicerol, ensayo 2.

% de glicerol	Medias
2	34.25
4	16.87
6	17.23

Tabla 29. Motilidades promedio para la interacción entre la yema de huevo y el glicerol de la tabla 26, ensayo 2.

% de yema de huevo	% de glicerol			Medias
	2	4	6	
10	32.86	15.68	12.79	20.44
15	38.93	24.70	22.76	28.79
20	30.96	10.25	16.13	19.11
Medias	34.25	16.87	17.23	22.78

Tabla 30. Comparación de motilidades promedio para el factor yema de huevo de la tabla 26, ensayo 2.

Tratamiento	Medias
15 % de yema	28.79 A
10 % de yema	20.44 B
20 % de yema	19.11 B

Nivel de significancia = 0.05
DMS = 1.99

Tabla 31. Comparación de motilidades promedio para el factor glicerol de la tabla 26, ensayo 2.

Tratamiento	Medias
2 % de glicerol	34.25 A
6 % de glicerol	17.23 B
4 % de glicerol	16.87 B

Nivel de significancia = 0.05
DMS = 1.99

Tabla 32. Comparación de motilidades promedio para la interacción entre yema de huevo y glicerol de la tabla 26, ensayo 2.

% de yema de huevo	% de glicerol	Medias
15	2	38.93 A
10	2	32.86 B
20	2	30.96 B
15	4	24.70 C
15	6	22.76 C
20	6	16.13 D
10	4	15.68 D
10	6	12.79 DE
20	4	10.25 E

Nivel de significancia = 0.05
DMS = 3.46

Tabla 33. Concentración de datos del ensayo # 3, en en donde la motilidad post-descongelado fue transformada a angulos Bliss (Steel y Torrie 1960).

A	B	I	II	III	IV
10	2	22.78	18.43	22.78	22.78
	3	11.53	12.92	18.43	12.92
	4	14.17	12.92	11.53	12.92
15	2	45.00	42.13	45.00	45.00
	3	36.27	33.21	39.23	33.21
	4	18.43	12.92	18.43	22.78

A = Niveles de yema de huevo en %

B = Niveles de glicerol en %

I, II, III Y IV, son el número de la repetición

Tabla 34. ANVA para los datos concentrados en la tabla 33, ensayo 3.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Yema de huevo	1	1625.26	1625.26	232.47	0.00
Glicerol	2	1222.66	611.33	87.43	0.00
Interacción	2	377.67	188.83	27.01	0.00
Error	18	125.85	6.99		
Total	23	3351.43			

C.V = 10.83 %

Tabla 35. Motilidades promedio para el factor yema de huevo de la tabla 34, ensayo 3.

% de yema de huevo	Medias
10	16.18
15	32.63

Tabla 36. Motilidades promedio para el factor glicerol de la tabla 34, ensayo 3.

% de glicerol	Medias
2	32.99
3	24.71
4	15.51

Tabla 37. Motilidades promedio para la interacción de yema de huevo - glicerol de la tabla 34, ensayo 3.

% de yema de huevo	% de glicerol			Medias
	2	3	4	
10	21.69	13.95	12.89	16.18
15	44.28	35.48	18.14	32.63
Medias	32.99	24.72	15.51	24.41

Tabla 38. Comparación de motilidades promedio para el factor yema de huevo de la tabla 34, ensayo 3.

% de yema de huevo	Medias
15	32.63 A
10	16.18 B

Nivel de significancia = 0.05
DMS = 2.27

Tabla 39. Comparación de motilidades promedio para el factor glicerol de la tabla 34, ensayo 3.

% de glicerol	Medias
2	32.99 A
3	24.72 B
4	15.51 C

Nivel de significancia = 0.05
DMS = 2.78

Tabla 40. Comparación de promedios de motilidad de la interacción de los factores yema de huevo-glicerol de la tabla 34, ensayo 3.

% de yema de huevo	% de glicerol	Medias
15	2	44.28 A
15	3	35.48 B
10	2	21.69 C
15	4	18.14 C
10	3	13.95 D
10	4	12.89 D

Nivel de significancia = 0.05
DMS = 3.99

CONCLUSIONES

Del presente estudio se plantean las siguientes conclusiones:

En el primer ensayo donde se probaron tres tiempos de centrifugación (2, 4 y 6 %), en combinación con cuatro velocidades de centrifugación (1000, 2000, 3000 y 4000 rpm), aunque no hubo diferencia significativa entre tratamientos se llegó a la conclusión de que la mejor combinación entre los factores tiempo y velocidad fue la de 4 minutos a 2000 rpm. debido a que, en la ultimas lecturas de motilidad tomadas, fue el unico tratamiento que, aunque baja, presentó motilidad.

En el segundo ensayo, donde se probaron tres niveles de yema de huevo (10, 15 y 20 %), en combinación con tres niveles de glicerol (2, 4 y 6 %) se encontro que la mejor combinación de estos factores en cuanto a motilidad se refiere la obtuvo la combinación de 15 % de yema de huevo con 2 % de glicerol en diluyente SOF, logrando conseguir motilidades post-desclngelado de 40 %.

El tercer ensayo se hizo solo para corroborar los resultados del segundo ensayo, solo que se redujeron los rangos de los niveles tanto de yema de huevo como de glicerol. Probandose dos niveles de yema de huevo (10 y 15 %) y tres niveles de glicerol (2, 3 y 4 %) obteniendose las mayores motilidades post-descongelado al igual que en el anterior.

motilidades post-descongelado al igual que en el anterior cuando se usó 15 % de yema de huevo y 2 % de glicerol. En este ensayo se obtuvieron motilidades hasta de 50 %, posiblemente debido a la mayor práctica en la técnica de la congelación.

RESUMEN

La finalidad de este trabajo experimental fue la de encontrar las mejores combinaciones en cuanto a centrifugación, y dilución se refiere para la criopreservación de esperma porcino, utilizando el diluyente SOFY.

Para este experimento se usó un verraco Hampshire-Duroc al que se le extrajo semen en distintas ocasiones por el método de la vagina artificial, utilizando un maniquí impregnado de orina de una cerda en celo para estimular la monta del semental al mismo.

El proceso que se le dio al semen desde su extracción hasta el congelado consistió primeramente en lavar el semen con el fin de eliminar el plasma seminal y concentrar los espermatozoides, para esto se utilizó el proceso de centrifugación y eliminación de sobrenadante. Una velocidad de centrifugación de 2000 rpm en un tiempo de 4 minutos, rindió muestras de esperma vivos (previa dilución en SOFY) hasta 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la dilución utilizando el diluyente SOFY (saliva artificial de McDougall, opuntia, fructosa y yema de huevo), una vez hecha la dilución se procedió a enfriar la muestra para después agregar el glicerol y posteriormente congelar. Las mejores motilidades (40 % y 50 %) post-descongelado se lograron cuando el esperma se diluyó en SOFY con una proporción :
15 % de yema de huevo

2 % de glicerol

73 % de saliva artificial de McDougall

10 % de mucilago de nopal

2.5 g de fructosa / 100 ml de diluyente

1000 U.I de penicilina / ml de diluyente

1 mg de estreptomicina / ml de diluyente

Una vez congelado el semen, se descongeló dejando las pastillas a temperatura ambiente por 3 minutos previos a diluirlos en el mismo diluyente (fracción A) a 39°C por 3 minutos.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, J. 1945. Semen of animals and its use for artificial insemination. Ed.(1) I.A.B. pp. 20,21,131 y 132.
- Bamba, K. y D. G. Cran. 1988. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. J. Reprod. Fert. 82: 509 - 518.
- Clark, A. E., R. L. Anderson. y B. A. Stone. 1979. Form and function arabino galactans and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry 18: 521.
- De Alba, J. 1985. Reproducción animal. Ed.(1) Prensa Médica Mexicana. México. pp. 123 - 149.
- Foote, R. H. 1976. Fertility of bull semen frozen with B-amylase, B-glucoronidase, and catalase, J. Dairy Sci. 59: 2014.
- García, C. J. 1986. Artificial insemination of goats in a brucellosis infected area using fresh semen diluted in milk or saliva - opuntia - fructose (SOF). Ph.D. Tesis New Mexico State University.
- Graham, E. F. y B. G. Crabo. 1972. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. Proc. VII th Int.

Congr. Anim. Reprod. Munich II, 1627 -1632.

Mann, T. 1948. Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality. J. Agr. Sci. 32: 323.

Martin, I. C. A. y W. C. Emmens. 1961. Effects of time of equilibration and addition of fructose on the survival and fertility of bull spermatozoa deep-frozen to -79°C . J. Reprod. Fertil. 2: 204.

Martin, I. C. A., y W. C. Emmens. 1958. Factors affecting the fertility and other characteristics of deep-frozen bull semen. J. Endocrinal. 17: 45.

McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep saliva. Biochem. J. 43: 99 - 109.

Nagase, H., E. E. Graham. y T. Niwa. 1964. Pelleted semen: The effect of glycerol level and composition of thawing solution on fertility of bovine spermatozoa. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Trento 4: 404 - 409.

Nagase, H. y T. Tomizuka. 1968. Protective effects of polyols against freezing injury of bull spermatozoa. II. Polyols effects in different freezing methods. Proc. VI th. Int.

Congr. Anim. Reprod. Paris, II, 1107.

Perez, F. 1966. Reproducción e inseminación artificial ganadera. Ed.(1) Científico - Médica. pp. 355-359.

Peterson, P. y S. Nordlund. 1958. Survival of bull spermatozoa after exposure to 150 atm. N for 15 days. *Experientia*. 14: 223.

Polge, C., A. U. Smith. y A. S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)* 164-166.

Pursel, V. G. y L. A. Johnson. 1971. Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci. Abstr.* 33: 1162.

Pursel, V. G. y L. A. Johnson. 1971. Fertility with frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci. Abstr.* 33: 265.

Pursel, V. G. y L. A. Johnson. 1972. Fertility comparison of boar semen frozen in two extenders. *J. Anim. Sci. Abstr.* 35: 1123.

Pursel, V. G. y L. A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40 (1): 99 - 102.

- Pursel, V. G., L. A. Johnson y L. L. Schulman. 1973. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 37 (2): 528 - 531.
- Pursel, V. G., L. A. Johnson y L. L. Schulman. 1973. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C. J. Anim. Sci. 37 (2):532 - 535.
- Pursel, V. G. y C. S. Park. 1987. Duration on thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5 ml maxi-straw. Theriogenology 28 (4): 683 - 689.
- Richter, L., E. Romeny., K. F. Weitze y F. Zimmerman. 1975. Deep freezing of boar semen. VII Communication: Laboratory and field experiments using the extender Hülseberg VII. Disch. Tierärztl. Wschr.82: 155 - 162.
- Rillo, S. M. 1982. Reproducción e inseminación artificial porcina Ed.(1) Aedos. España. pp. 75-97, 112-113.
- Salamon, S. y D. Visser. 1973. Fertility test of frozen boar spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 26: 291-293.
- Salamon, S., I. Wilmut. y C. Polge. 1973. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluents composition,

protective agents, and method of tawing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 26: 219-230.

Schwarze, E. 1970. Compendio de anatomia veterinaria. Sistema visceral. Ed.(1) Acribia. España. pp. 249-263.

Shettles, L. B. 1939. The respiration of human spermatozoa and their reponse to various gases and low temperatures. Amer. Jour. Physiol. 128 (2):408.

Sisson, S. 1974. Anatomia de los animales domesticos. Ed.(4) Salvat. pp. 581-584.

Smidt, D. y F. Ellendorff. 1972. Endocrinologia y fisiologia de la reproducción de los animales zootecnicos. Ed.(1) Acribia. España. p.231.

Sorensen, A. M. 1982. Reproducción animal principios y practicas. Ed.(1) McGraw-Hill. pp.1-60.

Steel, R. C. D. y J. H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill. N.Y., U.S.A.

Trachtenberg, S. y A.M. Mayer. 1982. Biophysical proprieties of opuntia ficus - indica mucilage. Phytochemistry 21: 2853.

VanDemark, N. L. y U. D. Sharma. 1957. Preliminary fertility

results from the preservation of bovine semen at room temperatures. J. Dairy Sci. 40: 438.

Wilmot, I. y C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. I. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. Cryobiology (14): 471-478.

Wilmot, I. y C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. II. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent wich contained only sugar and egg yolk. Cryobiology (14): 479 - 482.

Wilmot, I., S. Salamon. y C. Polge. 1973. Deep freezing of boar semen. II. Effects of method of dilution, glycerol concentration, and time of semen - glycerol contact on survival of spermatozoa. Aust. J. Sci. (26): 231-237.

