

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



PRUEBA DE 10 (Diez) DILUYENTES
PARA LA CONSERVACION DE SEMEN DE VERRACO

TESIS

Santiago Sosa Guajardo

1976

96

T

SF3

.M6

S6

C.1



1080063283

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



PRUEBA DE 10 (DIEZ) DILUYENTES PARA LA
CONSERVACION DE SEMEN DE VERRACO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO

PRESENTA

Santiago Sosa Guajardo

MONTERREY, N. L.

3726

ABRIL DE 1976

T
SF396
.M6
56

040.636
FA21
1976
c-5



A mi esposa:

BEATRIZ

Que con su amor y comprensión motivó
en mí el sentimiento del deber, e -
hizo posible que alcanzara una meta
mas en la vida.

A mis hijos:

SANTIAGO Y
LILIANA BEATRIZ

Con amor infinito.

Con admiración y respeto a mis padres:

SANTIAGO SOSA RAMOS

ALICIA G. DE SOSA

Quienes con su cariño y dedicación
lograron forjar un porvenir en mi
vida.

A mi hermano:

CARLOS

Que siempre supo brind
darme su apoyo moral
en todo momento.

AL DR. EDUARDO AGUIRRE PEQUEÑO

AL TEC. AGR. JOSE ALEJANDRO BRENES V.

MI AGRADECIMIENTO Y RECONOCIMIENTO POR SU
INAPRECIABLE AYUDA PARA LA REALIZACIÓN DE
ESTE TRABAJO.

A MIS MAESTROS, COMPAÑEROS Y AMIGOS

A MI ESCUELA

CON SINCERA FIDELIDAD
Y CARIÑO.

INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCION	1
LITERATURA REVISADA	4
RECOLECCION DEL ESPERMA	10
ESTUDIO DEL EYACULADO	13
MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOOIDES	16
CONCENTRACION	18
DILUCION DEL SEMEN DEL VERRACO	19
DILUCION Y CONSERVACION DEL ESPERMA	22
MENSTRUOS A BASE DE SOLUCIONES GLUCOSA- SULFATO-TAMPONIZADAS	25
MATERIALES Y METODOS	29,
MATERIALES USADOS	29
METODOS	30
ESTUDIO DEL EYACULADO	35
RESULTADOS	36
DISCUSION	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
RESUMEN	43
BIBLIOGRAFIA	45

I N T R O D U C C I O N

La inseminación artificial aplicada a los mamíferos no despertó mas que un interés puramente científico cuando en 1780 un fisiólogo italiano aplicó el método a los perros. - Alrededor de 1890 se procedió a hacer algo de uso práctico de la inseminación artificial en la cría caballar. Por primera vez se hizo uso de esta técnica para el mejoramiento - de los animales en la U.R.S.S. comenzando el programa con - caballos y poco después se aplicó al ganado bovino y al ovino, en 1938 la técnica era de uso corriente para la fecundación de yeguas, vacas y ovejas. Recientemente este método - ha sido profusamente empleado para proporcionar servicio a los porcinos, tanto en Europa como en el extremo oriente. - En varios países más del 50% de las marranas se les fecundan por medio de la inseminación artificial.

A partir del programa de inseminación artificial iniciado en Dinamarca, Estados Unidos, El Reino Unido y la - - U.R.S.S., este sistema avanzado de reproducción se ha generalizado por todo el mundo, en 20 años esta técnica ha crecido rápidamente, las cifras comparativas correspondientes a otros países clasificados en cuanto a esta actividad son las siguientes: Japón 95%, Holanda 75%, Inglaterra 55%, Alemania Occidental 45%, Estados Unidos 40% y Francia 40%.

Las razones fundamentales para este desarrollo sin paralelo es que la inseminación artificial brinda la oportunid

dad de cruzar machos genéticamente superiores con hembras en cualquier parte del mundo, aunque las técnicas de la inseminación artificial progresan de modo por demás rápido - para la cría de ganado lechero tan pronto este método se estableció para todas las clases de animales domésticos incluyendo abejas (3).

En México, la Secretaría de Agricultura y Ganadería cuenta con un magnífico centro de inseminación artificial para el fomento y desarrollo del ganado bovino, sin embargo, en el campo de la inseminación artificial de los cerdos apenas se incluye en la fase de inicio. De acuerdo a todos los investigadores en el ramo de la inseminación artificial, se dice que el futuro de la ganadería de cualquier país de mejoramiento progresivo, se traducirá indudablemente en bienestar del pueblo por una alimentación más abundante y barata (1).

La inseminación artificial como método de la reproducción animal en la especie suina, ha adquirido en estos últimos años una importancia insospechada, por una parte ha contribuido al gran desarrollo que va tomando en todos los países la explotación industrial del cerdo en función de la moderna ordenación agrícola. Serán suficientes unos - - cuantos años para que sea substituído el régimen explotación extensiva de razas poco precoces y de gran producción

de grasa, por otras de explotación en estabulación de mayor precocidad y especulación en producción de carne.

Considerando que una de las especies más difundidas en el medio rural es el cerdo y que al mejorarse la calidad del mismo, resultaría altamente beneficioso para toda la gente, pero especialmente a las clases económicamente débiles, por lo que al pensar en un medio rápido para mejorar esta calidad, se trató de hacer práctica la inseminación artificial, viendo los buenos resultados en bovinos - (8).

El siguiente trabajo de tesis trata de sobreponer uno de los principales problemas de la inseminación artificial de los cerdos, que es la conservación del semen del verraco "in-vitro" durante períodos de tiempo largos. Ya que este obstáculo impide que muchos países practiquen la inseminación artificial de cerdos en forma prácticamente comercial, pues es ésta la forma que más beneficios trae, sobre todo como ya se ha dicho en el medio rural.

LITERATURA REVISADA

Las ventajas de la inseminación artificial en la especie porcina pueden resumirse en:

a) Ahorro de sementales. La inseminación artificial - tanto en la especie porcina como en los demás casos, tiene como finalidad importante reducir el número de sementales en función procreativa, el rendimiento eyaculatorio de un semental, puede utilizarse para inseminación en condiciones normales de 15 a 30 hembras, circunstancias que ha tenido en cuenta el ciclismo sexual de las hembras separado a intervalos de 18 a 20 días significa que con un limitado número de sementales se puede fecundar de 200 a 300 hembras mensuales. Teniendo en cuenta el consumo a precio de sostenimiento que exigen los sementales de una explotación porcina, se deduce fácilmente el interés de la inseminación artificial como método económico de reproducción.

b) Profilaxis. Consiste en la posibilidad de evitar - la difusión de enfermedades infecto-contagiosas como la -- bruselosis capaz de transmitirse por la cópula dando lugar posteriormente a frecuentes abortos que originan por consiguiente pérdidas económicas.

c) Aspecto Zootécnico. La inseminación artificial permite en las explotaciones porcinas, los más audaces intentos de mejora zootécnica al hacer posible la difusión am--

plia y debidamente planteada del material seminal procedente de un semental extraordinario.

En definitiva, la inseminación artificial ha permitido en pocos años la obtención de líneas puras y estirpes nuevas de gran interés desde el punto de vista de producción industrial (1).

En estos últimos años se han realizado importantes investigaciones con el fin de conseguir una aplicación práctica de la inseminación artificial en la especie porcina.

Ito, Niwa, Kudo y Mizuho en 1948 señalaron haber obtenido un tanto por ciento de fecundaciones satisfactorias -- (62.5%) utilizando esperma de verraco sin diluir y conservado durante 24-48 horas a una temperatura de 15 °C.

Investigaciones posteriores, han demostrado que el esperma de verraco se conserva fácilmente en los diluyentes a base de yema de huevo o leche descremada a la temperatura de 7 °C. a 8 °C. El menstuo más recomendable parece -- ser el de glicocola-yema, utilizado por Polge en 1956.

La fracción gelatiforme que estorba a las manipulaciones de dilución se elimina. La adición de antibióticos como penicilina: 500 U., estreptomycinina 500 y por c.c. aumen

tan el tanto por ciento de fecundaciones. El grado de dilución varía de 1:4 a 1:10; el pH. debe situarse entre 7.4 y 7.6 y las inseminaciones, de ser posible se realizarán en el día. (Polge y Rowson, 1956).

Du Mensil, Du Buisson y Dauzier también en 1956 prepararon un menstuo compuesto de bicarbonato sódico, glucosa y leche descremada.

A la temperatura de 8 °C. este medio parece conservar el poder fecundante del esperma durante 48 horas (mínimo). Los resultados de inseminaciones practicadas con esperma así conservado, son comparables a los obtenidos con el medio glicocola-yema.

Después de haber ensayado diferentes diluyentes, Aamdal y Hofset dan su preferencia a la solución de citrato sódico al 3% adicionado a un 30% de yema de huevo, penicilina y estreptomina a una temperatura de 15-20 °C. Salisbury, Fuller y Willett preconizaron el diluyente a base de citrato-yema y es el medio que se utiliza con más frecuencia en el mundo; tiene la ventaja de ser simple, práctico y económico. El citrato sódico tiene la ventaja de proporcionar al menstuo un sistema tampón que utiliza la reacción del medio, impide una acidificación demasiado rápida y por lo tanto perjudicial para la cantidad del diluyente.

El citrato sódico es una sal que resulta de la acción de un ácido débil (ácido acético) sobre una base fuerte -- (hidróxido de sodio).

Tomando como punto de partida los resultados obtenidos en la dilución del esperma de toro, se han llevado a cabo experiencias a tal efecto en relación al eyaculado de verraco (4).

Nishikna y Walde, en 1949 y más adelante Wogort y Mayer en 1950, han señalado el efecto beneficioso del citrato-yema en la dilución del esperma del verraco partiendo del mensturo de Salisbury. Noli en Filipinas, durante los años de 1950-51 ensayó con éxito el método de Salisbury al que se le añadían sulfamidas conservando después el esperma diluido a 5 °C. y trabajando a títulos de 1:2 volúmenes, de modo que cuando se añadían sulfamidas a razón de 300 -- mg./100, dicho autor logró conservar la actividad zoospérmica hasta los 10-12 días.

En todo caso hay que tener en cuenta que tanto el método de Salisbury (citrato-yema) como el de Hardy y -- -- Phillips (fostato-yema) y el mensturo huevo-glicina, presentaron análogos resultados.

Polge ha experimentado comparativamente cada uno de --

los menstruos a base de yema de huevo llegando a los siguientes resultados:

1o. Después de la adición de los disolventes la cinetis espermática se mantenía normal.

2o. Ninguno de los menstruos aumentó el índice de supervivencia cuando las temperaturas se mantenían entre 15 y 20 °C. tratándose de eyaculados completos, mientras cuando se trabajaba con la fracción espermática se aumentaba el índice de supervivencia siempre que se conservase a - - - 3 °C.

3o. No se apreciaron diferencias notables en el comportamiento de los diluyentes utilizados en las mismas condiciones térmicas y entre los títulos comprendidos entre - - 1:1 y 1:19.

4o. El citrato-yema es menos eficaz que el resto de los menstruos, sobre todo cuando se intentaron conservaciones a temperatura de 19 °C. a 20 °C.

5o. El menstruo fosfato-yema fué en todo caso superior al citrato-yema, si bien a partir del cuarto día de conservación a 5 °C. apenas se aparecieron zoospermos vivos.

6o. Los mejores resultados se obtuvieron con los menstruos yema-glucosa, yema-glicina consiguiéndose hasta el 60 a 70 % de zoospermos vivos al cabo de 5 a 6 días de conservación a 5 °C.

7o. En general, a los 30 minutos de calentamiento después de enfriadas las diluciones, se consigue, al elevar - de nuevo la temperatura, perfecta motilidad espermática.

Como conclusión a los menstros ensayados, tenemos el particular efecto del fósforo asociado a la yema de huevo. Desde el punto de vista de F. Pérez y Pérez, es que el fósforo es interesante para vencer la hipociénesis espermática que normalmente se aprecia en el eyaculado suino, de modo que la yema de huevo actuaría en este caso beneficiosamente en función sobre todo a su contenido en fosfolípidos, lectinas y cefalinas.

La leche en la dilución del esperma del verraco fué - experimentada por Hoffmann en 1905. Más tarde, Mirkhaylov y Alquist, lo mismo que Tacker, llevaron a cabo la dilu---ción del esperma del verraco y caballo con leche descremada y total; previo calentamiento, agitación y filtración - sucesivamente. En general, los métodos de dilución de es--perma a base de leche pura descremada, asociada a la yema de huevo, proporcionaron buenos resultados. F. Pérez y Pérez ha experimentado el método citrato yema-leche siguiendo la tecnología de Jaquet y Cassou, con resultados aceptables, en un tiempo de conservación, sin embargo, no supe--rior a dos días (8).

RECOLECCION DEL ESPERMA

La recolección del esperma en el cerdo. Al principio -- planteó los mismos problemas que en otras especies, pero -- las soluciones han sido eficaces con respecto al carácter y manera de reaccionar de esta especie.

El verraco es un animal afectivo y bastante inteligente, y posee una capacidad de aprendizaje superior a la exhibida por otros animales domésticos. Estas características -- facilitan mucho al técnico la tarea de educarlo para que -- realice la monta y emita el semen a satisfacción.

En la mayoría de los casos el macho monta a la hembra en celo, sin embargo, los machos jóvenes o tímidos no verifican el salto, en estos casos se debe esperar a que el verraco gane edad y experiencia. Hay ocasiones en que el verraco se resiste a servir a una hembra estando presente una persona, pero esto se puede superar en unos cuantos días de acostumbramiento. Para efectuar la monta se preferirán lugares donde el verraco no haya sido sometido a intervenciones dolorosas como vacunación o descolmillado.

Una vez que el macho ha dado el salto, lo más frecuente es que realice movimientos de empuje durante algún tiempo antes de decidirse a efectuar la penetración. Es durante este período cuando el pene debe desviarse lateralmente pa-

ra introducirlo en la vagina artificial. Asiendo el glande con la mano enguantada simulando la presión del cuello vaginal, se incita con éxito al verraco a que cese los impulsos pelvianos y los giros del pene. Tan pronto como sucede esto y queda inmóvil, comienza de ordinario la eyaculación (5).

El semen de los verracos experimentados, acostumbrados a efectuar el coito en potros de monta, puede recogerse mejor embriando una hembra en el potro. Si se utiliza maniquí, este debe colocarse en un lugar frecuentado por el verraco y con el que éste asocie estímulos sexuales, -- con preferencia será un sitio donde haya cubierto a otras hembras.

La monta del maniquí puede constituir una operación sencilla o por el contrario, un proceso largo y tedioso, -- ello depende de varios factores pero principalmente del verraco y del técnico. Es importante que ambos derrochen paciencia y tenacidad durante las fases iniciales de la educación (7).

Para la recolección del semen existen los siguientes métodos: a) Colectores penianos; b) Recolección vaginal -- post-coitum; c) Colectores vaginales; d) Electro-eyaculador y e) Método parafisiológico o de la vagina artificial.

De los cuales este último es el que ha dado mejores resultados desde el punto de vista de la cantidad y calidad del semen.

El número de modelos de vaginas artificiales es muy variable; lo mismo puede decirse de los diversos tipos de maniqués empleados mediante los cuales se obtiene el eyaculado del verraco en la vagina artificial (1).

ESTUDIO DEL EYACULADO

El estudio del eyaculado comprende los siguientes aspectos:

a) Aspecto biológico.- La eyaculación del verraco se prolonga por espacio de 5-15 minutos, ya sea por el método de la vagina artificial o por la monta directa, el volumen promedio del semen eyaculado es de 250 c.c., este eyaculado consta de tres partes. La pre-espérmica que es una especie de lubricante pobre en espermatozoides, la espérmica rica en espermatozoides y la post-espérmica, que es un material gelatinoso que sirve de tapón en el cuello del útero evitando la salida del semen después de la cópula. Cuando se aísla perfectamente la fracción espermática de la pre y post-espérmica, los espermatozoides conservan mejor su estructura y actividad cinética. De estos antecedentes se desprende la importancia de la centrifugación del esperma y el lavado del sedimento para mejorar las condiciones biológicas del eyaculado.

b) Estudio físico del eyaculado.- Consiste en los siguientes aspectos:

Volumen: Se efectúa leyendo en el frasco de recolección la cantidad de semen eyaculado.

Color: El color normal del semen es blanco o blan

co amarillento, existen variaciones en color dependiendo de la alimentación, tam--bién puede haber eyaculado con sangre (color marrón) o eyaculado contaminado (co--lor azulado) por alguna infección.

Olor: El eyaculado ofrece un olor sui-generis - propio de la especie y acentuado en verracos viejos sometidos a intensa actividad sexual.

Opacidad: Es una condición física que está en fun--ción de la concentración de zoospermas o elementos en general.

Viscosidad: La mayor o menor viscosidad depende de --reacciones enigmáticas, en algunos casos existe una relación entre la viscosidad y la concentración del semen.

Pureza: Se refiere al grado de contaminación del eyaculado con sustancias orgánicas o in--orgánicas.

Acidez: El pH es muy variable y va desde 6.4 a --7.4, ya que las pocas horas de conserva--ción "in-vitro" el pH se acidifica debido al metabolismo de los zoospermas.

c) Microscopia del eyaculado.- Los zoospermas del ve--rraco prestan las mismas estructuras que las demás espe---

cies de mamíferos. Desde el punto de vista biológico, presentan una gran sensibilidad a los menstruos diluidores y menor capacidad de resistencia a la conservación "in-vi---tro", factores semejantes a los que presentan los zoospermas de los équidos.

d) Contrastación biológica.- 1) Microscópica, 2) Biológica; la primera comprende el estudio de la motilidad, - formas anormales, índice de resistencia, e índice de vitalidad o supervivencia. La segunda comprende el estudio del índice de reductasimetría a índice de fructuólisis.

MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOOIDES

El porcentaje de espermatozoides dotados de motilidad puede determinarse empleando un microscopio con la platina y el porta objetos calentado a 37 °C. la motilidad se registra a base de porcentaje a intervalos de 10, de 0 a 100. Raras veces se observa un porcentaje superior a 80%.

Tres son los tipos posibles de motilidad de los espermatozoides:

1) Movimiento de avance, 2) Movimiento rotatorio o circular y 3) Movimiento ondulatorio sin cambio de posición.

El índice de motilidad, en especial en las muestras -- contaminadas de semen después de tenerlos guardados, revela la calidad del semen. Los índices de motilidad pueden registrarse sobre las bases siguientes:

- 0.- Espermatozoides sin movimiento de avance.
- 1.- Motilidad indolente, desplazamiento lento hacia adelante, con muchos espermatozoides ondulantes.
- 2.- Motilidad algo indolente, que todavía avanza, pero no en forma rápida y centellante.
- 3.- Motilidad intermedia, no la mejor, pero de avance bastante rápido.
- 4.- Máxima motilidad de avance, muy rápida y centellanan

te, sólo se encuentra en un pequeño porcentaje de muestras.

Cuando se evalúa el semen con experiencia, las clasificaciones pueden fraccionarse a intervalos de 0.5.

CONCENTRACION

Como se menciona anteriormente, el eyaculado normal - del verraco tiene un volúmen promedio de 250 c.c. y consta de tres partes, de las cuales la primera y la última contienen un porcentaje bajo de espermatozoides y la parte - media o espermática contiene hasta un 80% de zoopermas.

El eyaculado completo del verraco (adulto) contiene - por término medio de 40 a 50 x 10⁹ espermatozoides. Esto supone una concentración de 200 a 250 x 10⁶ células por -- c.c. de semen íntegro y filtrado. Existen sin embargo, des_uviaciones considerables de este promedio, según la edad -- del macho, frecuencia de las eyaculaciones, condiciones de raza, etc. Pero en lo que se refiere a la porción rica en espermatozoides (espermática) contiene un promedio de 600 a 700 x 10⁶ por c.c. de células y esto viene a constituir del 20 al 25% del volumen completo del eyaculado (6).

DILUCION DEL SEMEN DEL VERRACO

En estos últimos años se han llevado a cabo importantes investigaciones con el objeto de conseguir una aplicación práctica de la inseminación artificial en la especie porcina.

Ya en 1948, algunos autores señalaron haber obtenido un 62.5% de fecundaciones satisfactorias utilizando esperma de verraco sin diluir y conservado durante 24 a 48 horas a una temperatura de 15 °C.

Posteriores investigaciones han demostrado que el semen puede conservarse fácilmente en los diluyentes a base de yema de huevo o leche a la temperatura de 15 °C.

Los diluyentes del semen aportan: Elementos nutritivos, para los procesos metabólicos de los espermatozoides, protección contra el shock frío, efecto amortiguador contra el ácido láctico producido por el metabolismo de los espermatozoides, una sustancia reductora para la protección de determinadas enzimas, y CO_2 (sólo en determinados diluyentes) que pone un alto a la motilidad y disminuye el metabolismo de los espermatozoides. También ayuda a conservar la presión osmótica y el equilibrio mineral adecuados (2).

En Noruega, veterinarios del Colegio Oslo, efectuaron - 451 fecundaciones artificiales en cerdas, usando 150 a - 200 c.c. de esperma diluido y conservado hasta 60 horas, - conteniendo de 41 a 100 miles de millones de células por - dosis. Los resultados obtenidos fueron de 59.4% de gesta-- ciones con una media de 9.93 lechones por camada.

En 1946 se obtuvieron los mejores resultados con los menstros yema-glucosa consiguiendo hasta el 60 a 70% de - zoopermos vivos al cabo de 5 ó 6 días de conservación a -- una temperatura de 5 °C.

Regularmente se consigue la perfecta movilidad de los espermatozoides a los 15 a 30 minutos de calentamiento -- después de enfriadas las soluciones.

Antes de efectuar la dilución del semen recolectado, este es sometido a una serie de pruebas "test" conocidas - también como "valuación" del semen, tales como: volumen, - consistencia, color, movilidad, concentración, pH., reduc- ción del azul de metileno y determinación de espermatozooi des anormales, vivos y muertos.

La reducción del azul de metileno consiste en la rapi- dez con que desaparece la coloración azul de la mezcla del semen y nos indica en general que el semen es bueno si la

coloración desaparece entre 6 y 9 minutos, excelente en - -
- 3^{1/2} a 6 minutos, regular de 9 a 12 minutos y desechable
de 12 minutos en adelante.

Formas anormales.- La apreciación de formas anormales
y muertas en el eyaculado pueden determinarse por los mis--
mos métodos utilizados en otras especies, coloración vital,
tinciones espermáticas, etc. (6).

El porcentaje de formas anormales aumenta en el cerdo
a medida que el mismo se produce un cansancio sexual, agota--
miento, etc., fenómenos que por lo general son consecuencia
de una intensa actividad sexual, que requiere distanciar --
más la recogida del esperma. En este caso se encuentran - -
zoospermas gramnegativos, parcialmente granulosos y de co--
las múltiples, fracturados, globosas, etc., mientras que en
material procedente de animales en abstinencia sexual, con
frecuencia se aprecian zoospermos calvos y formas cefálicas
deformes, globosas, etc.

El porcentaje de formas anormales o muertas que gene--
ralmente se encuentran en el ganado porcino es elevado, a -
consecuencia de choques iónicos que tienen lugar en el mo--
mento de la recolección. Puede admitirse de un 15 a un 20%
de formas anormales y muertas, en el eyaculado recién reco--
lectado (3).

DILUCION Y CONSERVACION DEL ESPERMA

La dilución del esperma va precedida de un exámen microscópico y bioquímico.

La dilución del semen tiene por objeto aumentar el volumen total de la masa espermica con el fin de poder inseminar con una sola eyaculación el mayor número de hembras posible, y crear por otra parte un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides "in-vitro". Los medios de dilución deben responder a las siguientes cualidades:

a) PRESION OSMOTICA.- Las soluciones fisiológicas utilizadas deberán tener el mismo punto de congelamiento que el semen.

b) pH.- Debe ser favorable para la conservación de la vitalidad espermática.

c) PODER TAMPON.- Las sustancias tampón deben proteger el esperma contra las variaciones del pH. Las sustancias tampón tienen poca importancia en los espermas de baja concentración como el del verraco; en cambio, tienen mucha importancia para los espermas de morrueco y toro, pues debido a su alta concentración de espermatozoides, presentan una glucolisis intensa.

d) El diluyente debe tener cationes y aniones ~~carentes~~ de toxicidad.

Es conveniente que el medio de dilución sea de fácil - preparación y que su precio no sea muy elevado.

Como el esperma es un producto muy sensible a la acción de diferentes factores exteriores, deberá ser recogido con el máximo cuidado teniendo en cuenta:

1) No utilizar nada más que recipientes o utensilios - esterilizados.

2) Evitar los "choques" térmicos producidos por temperaturas demasiado elevadas o muy bajas.

3) Impedir el contacto con el agua o diferentes sustancias químicas.

4) Guardar el semen al abrigo de la acción directa de la luz o del aire libre.

La contrastación espermática deberá realizarse lo más rápido posible después de la recolección y la dilución se - llevará a cabo sin demora.

La dilución del esperma del cerdo presenta los mismos problemas de aspecto biológico que se consideran para el semen del garrón. Lo mismo que en el eyaculado equino, hay - que partir de que el mayor peligro de la supervivencia "in-vitro" de los espermatozoides lo constituyen las secreciones glandulares paragenitales, que en mayor proporción integran el volumen total del eyaculado. En todo caso, a las --

seis horas de conservación "in-vitro" de los zoospermas -- pierden la actividad motora cuando se encuentran disueltos en el eyaculado total, mientras que cuando aquel se elimina por centrifugación o colado, la supervivencia se prolonga -- por muchas horas.

En definitiva, los métodos de dilución del esperma sui no los podemos dividir en varios grupos haciendo constar -- que: En la mayor parte de los casos, lo que se pretende es aumentar el volumen del eyaculado, ya que la supervivencia "in-vitro" a largo plazo de los espermatozoides se consi-- gue en el verraco con gran dificultad más allá de las 350 -- horas.

MENSTRUOS A BASE DE SOLUCIONES GLUCOSA-SULFATO-TAMPONIZADAS

Constituye un método primitivo y con éxito. Se basa en proporcionar a los zoospermas material energético de una -- parte y tamponización de la acción protectora de los sulfatos.

Existen dos metodologías a tal respecto, la Italiana y la Rusa, que en general son muy parecidas entre sí, ya que en ambas fórmulas lo que se persigue es buscar un equilibrio entre el Na, Ca y Mg., por otra parte, la incorporación de S en forma de sulfatos, a fin de proteger los zoospermas constituye algo esencial que realmente significa la mayor -- parte del éxito de dichos menstros.

Estos menstros de diluyococonservación del esperma no -- consigue conservar la vitalidad del esperma y su capacidad fecundante arriba de 48 horas. Este método es fácil de preparar, de bajo costo y total garantía de esterilidad (8).

En 1957 Van Demarek y Shorma investigadores de la Universidad de Illinois, pudieron demostrar la posibilidad de conservación "in-vitro" del esperma de toro en una atmósfera de CO₂.

También lograron preservar el semen del verraco a la temperatura del laboratorio. La preparación del menstruo lo dieron a conocer con el nombre de I.V.T., siglas que corresponden a las iniciales Illinois Variable Temperature.

Esta es la fórmula: Citrato de Sodio 20.0 grs., bicarbonato de sodio 2.1 grs., cloruro de potasio 0.4 grs., glucosa Q.T. 3.0 grs., sulfamida 3.0 grs., disuelta por calentamiento. Todas estas substancias se disuelven en un litro de agua destilada en un frasco aforado.

Esta solución fue luego enfriada a la temperatura del laboratorio y saturada de CO₂ dejando obrar el gas durante - 10 minutos o hasta que el pH sea reducido a 6.35. Después de la saturación con CO₂ añadieron 1000 U.I. de penicilina y 1000 microgramos de sulfato de dihidroestreptomicina por ml., de agua destilada con una solución de yema de huevo correspondiente al 10% del diluyente.

Partiendo de estas originales experiencias de tan alentadores resultados, Du Mesnil, Du Buisson y R. Jondet experimentaron a gran escala, en el Centro Nacional de Investigaciones Zootécnicas de Jony, en Jajos Francia, los efectos que determinaba el CO₂ en el esperma del verraco.

En 1958 Du Mesnil, Du Buisson y Dauzier, lanzaron al -

mundo científico el resultado de sus experiencias consistentes en el "Mantenimiento del poder fecundante del esperma - del verraco en presencia de gas carbónico" y "El mejoramiento de las técnicas de conservación del semen del verraco -- por dilución a saturación del anhídrido carbónico en el medio de conservación y condiciones de su utilización práctica".

Los resultados obtenidos por sus métodos a través de - - 6,059 inseminaciones artificiales dan un porcentaje de fecundalidad de 52.17.

Los resultados de las investigaciones continuadas por Du Mesnil, Du Buisson y colaboradores, han sido cada vez -- más satisfactorios; así lo revelan en su trabajo presentado al Congreso de Patología de la Reproducción e Inseminación Artificial, celebrado en Italia en 1964. En él señalaron -- también la "Importancia de un método de conservación para - el esperma del verraco capaz de mantener el poder fecundante de un porcentaje de 50 a 72% después de tres a seis días de conservación (1).

Polge, pionero investigador en el campo del semen del verraco a -79 °C. ha tratado de dilucidar este complejo problema, dicho autor ha confirmado un 25% de espermatozoides móviles después del calentamiento, por lo que el semen en -

estas condiciones está muy lejos de ser satisfactorio para continuar estudios con su aplicación en la inseminación artificial.

Para la congelación del esperma del verraco, Polge recomienda el siguiente método: Dilución del esperma a partes iguales con una solución de glucosa al 20%, la que generalmente lleva un 25% de yema de huevo. A continuación se comienza a refrigerar la muestra resultante, hasta llegar a la temperatura de 15 °C. a 10 °C., luego se vuelve a diluir con una solución de glicerina de modo que la concentración total de la misma quede establecida en un 8 a 10%.

La técnica a tal efecto es la misma que se sigue para el esperma de toro. En todo caso los resultados no pueden considerarse como ideales. Por lo que respecta a la congelación del esperma del verraco, debe considerarse hoy día como un método en estudio, ya que quedan por resolver muchos aspectos en lo que se refiere a la obtención de un porcentaje adecuado de formas zoospérmicas vivas y fecundantes después de la congelación (8).

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de este experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la U. A.N.L., y en el Laboratorio de Química y Bromatología de la misma.

El presente trabajo se desarrolló entre los meses de mayo de 1972 a marzo de 1973.

MATERIALES USADOS.

Para el desarrollo de este experimento se usaron diversos materiales entre los que podemos citar los siguientes:

1.- Para la extracción de semen se utilizaron dos verracos adultos, una vagina artificial para verracos y cerdas en celo.

2.- Para la preparación, regularización del pH y esterilización de los diluyentes, se utilizaron las siguientes sustancias y material de laboratorio.

- a) Agua destilada
- b) Jugo de papaya
- c) Jugo de melón
- d) Jugo de sandía

- e) Jugo de caña de azúcar
- f) Miel de maíz
- g) Miel de abeja
- h) Citrato de Na. y ácido cítrico.

METODOS.

Todos los diluyentes fueron regulados a un pH. de 7.3 - ya que a las pocas horas de conservación "in-vitro" el pH. - se acidifica debido al metabolismo de los zoospermas (Polge en 1956). La preparación de éstos fue de la siguiente manera:

Diluyente No. 1.- EXTRACTO DE SANDIA

100 c.c. Agua destilada

350 c.c. Extracto de Sandía pH. 6.2.

50 g. Citrato de Sodio.

Diluyente No. 2.- EXTRACTO DE PAPAYA

200 c.c. Agua destilada.

350 c.c. Extracto de Papaya pH. 4.5.

160 g. Citrato de Sodio.

Diluyente No. 3.- EXTRACTO DE MELON

100 c.c. Agua Destilada.

350 c.c. Extracto de Melón pH. 6.9.

100 g. Citrato de Sodio.

Diluyente No. 4.- MIEL DE COLMENA AL 20%.

280 c.c. Agua destilada.

70 c.c. Miel de Colmena.

55 gr. Citrato de Sodio.

Diluyente No. 5.- MIEL DE MAIZ AL 20%

280 c.c. Agua destilada.

70 c.c. Miel de Maíz.

13 g. Citrato de Sodio.

0.01 g. Acido Cítrico.

Diluyente No. 6.- JUGO DE CAÑA.

450 c.c. Jugo de Caña p.H. 5.7

10 g. Citrato de Sodio.

Diluyente No. 7.- GLICOCOLA (Polge 1956).

70 c.c. Agua Destilada.

2 g. Glicocola.

15 c.c. Citrato de Sodio al 3%.

Todos estos diluyentes después de preparados se esterilizaron en la autoclave y posteriormente se conservaron en el refrigerador a una temperatura de 5 °C.

Ya que todos los diluyentes estuvieron listos para su uso, se hicieron cuatro extracciones de semen después de haber adiestrado a los sementales para acostumbrarlos a las manipulaciones y al trato con gente extraña. Las extracciones se hicieron todas con la vagina para verracos y utilizando cerdas en celo, ya que el uso del maniquí de monta -- fue infructuoso.

El 23 de febrero de 1973 se extrajeron 230 c.c. de semen que se conservó durante cuatro horas a una temperatura de 37 °C., posteriormente se filtró la fracción gelatiforme, se procesó y se hicieron las siguientes diluciones con concentraciones de 1:5 (Polge Rowson 1956).

Dilución I.

3.5 c.c. Diluyente No. 1

1.5 c.c. Yema de huevo

1.0 c.c. Semen

Dilución II.

7 c.c. Diluyente No. 2

3 c.c. Yema de huevo

2 c.c. Semen

Dilución III.

3.5 c.c. Diluyente No. 3

1.5 c.c. Yema de huevo

1.0 c.c. Semen

Dilución IV.

7 c.c. Diluyente No. 4

3 c.c. Yema de huevo

2 c.c. Semen

El 9 de marzo de 1973 se extrajeron 115 c.c. de semen, el cual se filtró y procesó a la media hora de extraído, y se mantuvo a una temperatura promedio de 32 °C.

La concentración que se le dió a las diluciones que se

hicieron con esta eyaculación fue de 1:5 como las anteriores, y los diluyentes procesados son los siguientes:

Dilución V.

5 c.c. Diluyente No. 5

5 c.c. Yema de huevo

2 c.c. Semen

Dilución VI.

7 c.c. Diluyente No. 6

3 c.c. Yema de huevo

2 c.c. Semen

Dilución VII.

7 c.c. Diluyente No. 7

3 c.c. Yema de huevo

2 c.c. Semen

El 10 de marzo de 1973 se extrajeron 195 c.c. de semen, los mismos que fueron filtrados y procesados en concentraciones de 1:10 con los siguientes diluyentes:

Dilución VIII.

10 c.c. Diluyente No. 6

10 c.c. Citrato de Sodio al 3%

Total = 20 c.c. Diluyente No. 6/ Citrato al 3%

5 c.c. Diluyente No. 6/ Citrato al 3%

5 c.c. Yema de huevo

1 c.c. Semen

Dilución IX.

10 c.c. Diluyente No. 1
 15 c.c. Citrato de Sodio al 3%
 Total = 25 c.c. Diluyente No. 1/ Citrato al 3%
 5 c.c. Diluyente No. 1/ Citrato al 3%
 5 c.c. Yema de huevo
 1 c.c. Semen

Dilución X.

10 c.c. Diluyente No. 3
 15 c.c. Diluyente No. 7
 Total = 25 c.c. Diluyente No. 3/ Diluyente No. 7
 5 c.c. Diluyente No. 3/ Diluyente No. 7
 5 c.c. Yema de huevo
 1 c.c. Semen

A todas las diluciones que se procesaron en este experimento se les agregaron antibióticos a razón de 240 mg., de penicilina y 400 mg. de estreptomocina (Du Mesnil, Du Buisson y Dausier 1956).

Inmediatamente después de terminadas cada una de las diluciones se pusieron los tubos de ensaye en que se colocaron; en otros más grandes y éstos previamente tapados y etiquetados se colocaron en vasos de precipitado con un poco de agua para que las diluciones se enfriaran poco a poco y posteriormente se colocaron en el refrigerador a una temperatura de 5 °C. (Salisbury, Fuller y Willett 1950), para después observar a las 24 horas.

A todas las eyaculaciones se les hizo examen microscópico previo a las diluciones, el cual en promedio es como sigue:

- a) DENSIDAD:- 353 Millones/cm.³
- b) MOVILIDAD:- Indolente e intermedia de avance rápido y -- centellante.
- c) PORCENTAJE DE VIVOS Y MUERTOS:- Aproximadamente el 91% - de vivos.
- d) MORFOLOGIA:- No se encontraron células en un porcentaje significativo con morfología anormal.

ESTUDIO DEL EYACULADO:

- a) VOLUMEN:- De 50 c.c. a 230 c.c.
- b) COLOR :- Blanco
- c) OLOR :- Sui-generis
- d) pH. :- De 7.0 a 7.5

RESULTADOS

Lo que podemos considerar más importante en cualquier trabajo de investigación o experimentación son precisamente los resultados obtenidos. A continuación se describen los resultados del presente trabajo.

Las diluciones I, II, III, IV, V, VI y X, se checaron inmediatamente después de procesarse, manteniéndose a una temperatura de 37 °C., encontrándose al ver las muestras en el microscopio, espermatozoides sin movimiento de avance, solamente ondulante y en una mínima parte se encontraron células con movimiento de avance lento.

Al observar de nuevo estas diluciones a las 24 horas se encontraron todas las células muertas, después de haberse conservado durante este lapso a una temperatura de 5 °C.

La dilución VII.- También se checó después de prepararse y se observó una motilidad intermedia de avance rápido y centellante, se conservó así a la temperatura del laboratorio durante dos horas y se checó de nuevo en el microscopio observándose la misma motilidad.

A las 24 horas de conservada la muestra a una temperatura de 5 °C., seguía con motilidad y se procedió a hacer -

tinciones para verificar el porcentaje de vivos y muertos, encontrándose el 75% de células vivas y el 25% de células muertas.

Después de 48 horas de conservarse a 5 °C. seguía con una motilidad regular de avance, al hacer de nuevo las tinciones se encontró un 45% de células vivas y un 55% de células muertas.

A las 72 horas se observó una movilidad más lenta pero todavía de avance, y al hacer tinciones se encontró el 37% de células vivas y el 63% de células muertas.

Se siguió conservando a los 5 °C. y a las 96 horas de preparada la dilución, se observó muy poca movilidad de avance, encontrándose en la mayor parte un movimiento ondulante, al hacer tinciones, solamente se observó el 26% de células vivas y el 74% de células muertas, también se observó que el pH. había descendido de 7.3 a 6.5.

La dilución VIII.- Se checó inmediatamente después de preparada, observándose al microscopio un movimiento intermedio, rectilíneo y de avance, además en algunas células se observó un movimiento de avance en zig-zag, y también se observaron células con movimiento latente.

A las dos horas de preparada la dilución y conservada

a la temperatura del laboratorio, seguía con buena motilidad de avance rectilíneo y en zig-zag.

Después de 24 horas de preparada y conservada a 5 °C. se observó la mayoría de las células muertas y solo unas pocas con movimiento latente, por lo cual no se hicieron tinciones.

La dilución IX.- Después de preparada mostraba un movimiento bastante bueno, rectilíneo de avance y en zig-zag. Se siguió conservando también a la temperatura del laboratorio durante dos horas, se observó al checar al microscopio que seguía con buen movimiento rectilíneo, de avance y también en zig-zag.

A las 24 horas de preparada y conservada a 5 °C. se encontró el 50% de células vivas, pero con movimiento latente y no de avance, y el 50% de células muertas.

DISCUSION

Como se hace ver en la sección de resultados y en la figura dada anteriormente, se observó que la dilución VII - preparada a base del diluyente No. 7 (Glicocola-yema) recomendada por Polge en 1956, tuvo una notoria diferencia comparada con las demás diluciones, pues ésta logró conservar el semen hasta 96 horas a una temperatura de 5 °C.

Aunque lográndose un porcentaje muy bajo de células vivas (26%).

La dilución IX. Fue la que tuvo mejor motilidad y avance, así como el mejor aspecto en el microscopio al momento de la dilución, después de la VII, pero después de conservada 24 horas a 5 °C. se observó que su motilidad se redujo a un movimiento lento y latente, debido posiblemente a que la temperatura a que fue conservada no era la adecuada, ya que se estima que debería haber sido más alta.

En la dilución VIII. Se observó también una buena motilidad, aunque no presentaba al mismo aspecto al microscopio como la dilución IX, pero después de 24 horas de conserva--ción a 5 °C. se encontró la mayoría de las células muertas.

En las diluciones I, II, III, IV, V, VI, y X, no mos--

traron ninguna respuesta a los diluyentes, pues en el momento de la dilución se observaron células con movimiento muy lento, otros con movimientos ondulantes y la mayoría de ellas aparecieron muertas. A pesar de que en la dilución X, el semen se diluyó en proporción de 1:10 y que se mezclaron dos diluyentes para llevar a cabo esta dilución, no se notó ninguna diferencia entre las demás diluciones probadas.

Lo anterior se hace notar porque las diluciones VII y IX también fueron diferentes a las demás en cuanto a la concentración del esperma que también fue de 1:10, solo que en estas diluciones se utilizó citrato de sodio al 3%, y no se usaron mezclas de dos o más diluyentes. Quizá esto fue factor determinante para conservar el semen vivo durante 24 horas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De todos los resultados obtenidos en el experimento, - puede concluirse y recomendarse lo siguiente:

1.- Tomando en cuenta el tiempo que se logró conservar el semen, podemos concluir que la dilución VII hecha a base de glicocola y citrato de sodio, fue la que conservó más -- tiempo vivo el semen (96 horas) a 5 °C. (26% de células vivas).

2.- Se concluye que las diluciones I, II, III, IV, V, VI y X no tuvieron diferencias significativas al momento de hacer la dilución, como tampoco a las 24 horas de conservarse a 5 °C.

3.- Se concluye también que las diluciones VII y IX no tuvieron diferencias significativas al momento de la dilu-- ción, ni a las dos horas de conservarse a la temperatura -- del laboratorio. Pero si se encontró gran diferencia a las 24 horas de conservadas a 5 °C.

4.- Respecto a la preparación de los diluyentes, se ha ce notar que los preparados a base de miel de maíz, miel de abeja, y glicocola, fueron los más sencillos de preparar, - ya que los restantes necesitaron varias filtraciones para -

poder sacar un extracto limpio.

5.- Se recomienda repetir el experimento con las diluciones VII, VIII y IX probando distintas concentraciones de semen y otras temperaturas de conservación.

6.- Se recomienda también hacer mezclas de diluyentes con diluyentes; y diluyentes con citrato de sodio al 3%, -- probando también nuevas concentraciones y diferentes temperaturas.

7.- Al llevar a cabo las recomendaciones de los puntos 5 y 6 se recomienda utilizar los pH. entre 7.0 y 7.6.

R E S U M E N

Con este experimento se pretendió encontrar un diluyente adecuado para la conservación del esperma de verraco, haciendo uso de mieles y extractos de frutas con alto contenido de azúcares o fructosas.

Este trabajo fue desarrollado en el Campo Experimental de la U.A.N.L. y en el Laboratorio de Química y Bromatología de la misma.

Los diluyentes fueron hechos a base de extractos de frutas perfectamente filtradas y esterilizadas y de miel de abeja y de maíz al 20% más yema de huevo y citrato de sodio.

Los primeros diluyentes se prepararon el 26 de mayo de 1972, procediéndose a filtrar y esterilizar perfectamente - añadiendo antibióticos para preservarlos y después regularlos a un pH. de 7.3 y guardarlos en el refrigerador a una temperatura de 5 °C.

Se hicieron tres extracciones de semen con la vagina artificial para verracos, las cuales se procesaron con distintos diluyentes cada una.

Todas las diluciones preparadas se observaron al mi---

croscopio inmediatamente después de preparados y se volvieron a checar a las 24 horas después de conservarse a 5 °C.

La dilución VII se checó a las 24, 48, 72 y 96 horas - respectivamente, haciéndose tinciones para determinar el -- porcentaje de vivas y muertas.

A las tres extracciones se les hizo un estudio físico del eyaculado para determinar: a) Densidad, b) Movilidad, - c) Porcentaje de vivas y muertas, d) Morfología, e) Volumen, f) Color, g) Olor, y h) pH.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Aguirre Pequeño, E. 1967. El CO² en la Conservación del Esperma del Cerdo.- Verraco- e Inseminación.- - Instrumental de Cerda. Boletín de Sociedad Nuevoleonesa de Historia Natural "Dr. J. Eleuterio González", Monterrey, N.L. p.p. 107-131.
- 2) Flores Méndez, A. y A. Argaz G. 1965. Ganado Porcino, - Cría, Explotación e Industrialización.- Ediciones Agrícolas "TRUCO", México, D.F.
- 3) Bonadona, T. 1962. Fisiopatología de la Reproducción y Fecundación Artificial Ganadera.- Salvat Editores, S.A., Madrid, España, 1a. Edición, pp. - - - 628-642.
- 4) Derivaux, J. 1961. Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Animales Domésticos.- Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp. 311- - - 352.
- 5) Díaz Montilla, R. 1959. Ganado Porcino.- Salvat Editores, S.A., Barcelona, España, 2a. Edición. pp.- - 199-209.
- 6) Herrick and Self. 1964. Evaluación de la Fertilidad del Toro y del Verraco.- Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp. 57-65.
- 7) Hess, E. A., Luwick, T.M. and Teoge, H.S. 1960. Artificial Insemination of Swine.- Ohio Agricultural Experiment Station, Wooster, Ohio. Research Circular No. 90, pp. 3-13.
- 8) Pérez y Pérez, F. 1966. Reproducción e Inseminación Artificial Ganadera.- Ed. Científico Médica, Barcelona, España. pp. 355-380.

