

EVALUACIÓN DE SEMEN PORCINO CONSERVADO EN DILUYENTES DE LARGA DURACIÓN. PRUEBAS IN VITRO

G. Ochoa¹, M.J. Acosta², Madelyn Rueda² y R. Ortega¹

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México
email: rortega9@hotmail.com

² Instituto de Investigaciones Porcinas. Gaveta Postal No. 1. La Habana, Cuba
email: mjacosta@iip.co.cu y mrueda@iip.co.cu

RESUMEN

Se evaluó en semen de cerdos el comportamiento de los diluyentes con los nombres comerciales Androhep, Bütschwiler (Modena Modificado), MR-A y Reading, para lo cual se realizaron pruebas in vitro. Se colectó dos veces por semana la fracción rica del eyaculado de cuatro sementales jóvenes de la raza Large White, durante dos meses. Después de la evaluación inicial para determinar la concentración, motilidad y morfología espermática, cada eyaculado se diluyó en cantidades iguales en los diluyentes y se conservó en alícuotas de 100 mL con concentraciones de 3.5×10^9 , a temperaturas de 15 a 18°C, durante 5 días. En el semen diluido, las variables evaluadas fueron la motilidad espermática, la morfología acrosomal y el pH. Las observaciones para cada variable fueron realizadas inmediatamente después de la dilución y posteriormente cada 24 horas hasta las 120 horas.

Se determinó que los porcentajes promedio de motilidad espermática obtenidos hasta las 120 horas de conservación para Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading fueron de 55.4, 57.8, 39.2 y 65.6%. El porcentaje de acrosomas normales hasta las 120 horas de preservación, para cada diluyente, fue de 78.3, 75.8, 77.0 y 75.0 respectivamente. De acuerdo con estos resultados, el diluyente que mejor conservó la motilidad espermática fue el Reading. Sin embargo este diluyente presentó los más bajos porcentajes en morfología del acrosoma, siendo el Androhep el que mejores resultados mostró.

En síntesis, los diluyentes con un pH ligeramente ácido (6.7-6.9) favorecieron la motilidad espermática, en tanto que la morfología acrosómica se mostró independiente del pH y sólo ligeramente correlacionada con la motilidad de los espermatozoides.

Palabras claves: cerdo, verraco, semen, conservación, diluyente de larga duración

Título corto: Conservación de semen porcino

EVALUATION OF PIG SEMEN PRESERVED WITH LONG TERM DILUENTS. IN VIVO TESTS

SUMMARY

The behaviour of several diluents commercially named Androhep, Bütschwiler (Modena Modified), MR-A and Reading was evaluated in boar semen by several in vitro tests. Two times per week the rich fraction of ejaculates from four young Large White boars was collected during two months. After the initial evaluation for determining spermatozoa concentration, motility and morphology, every ejaculated was diluted with similar amounts of diluents and was kept in aliquots of 100 mL (cell concentration, 3.5×10^9) at 15 to 18°C during five days. Variables measured in diluted semen were spermatozoa motility, acrosomal morphology and pH. The observations for every variable were conducted immediately after dilution and thereafter every 24 hours until 120 hours.

It was found that average values of spermatozoa motility measured up to 120 hours of semen conservation were 55.4, 57.8, 39.2 and 65.6% for Androhep, Bütschwiler, MR-A and Reading diluents, respectively. Normal acrosoma up to 120 hours of preservation was 78.3, 75.8, 77.0 y 75.0% respectively for the four diluents, in the same order. According to these results, Reading was the diluent which better kept cell motility. However, Reading showed the lowest percentages of acrosomal morphology, whereas Androhep was the diluent with a better performance in this index.

In summary, those diluents exhibiting a pH slightly acid (6.7-6.9) favoured spermatozoa motility, whereas acrosomal morphology showed an independence from pH and was only slightly correlated to cell motility.

Key words: pig, boar, semen, conservation, long term diluent

Short title: Conservation of pig semen

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) favorece la detección de machos sub-fértiles a través de las pruebas in vitro (Rillo et al 1993; Waberski et al 1994; Flowers 1996), reduciéndose de esta forma la cantidad de hembras que retornan a estro por este concepto y en consecuencia, se presenta una reducción paralela en el consumo de alimento y en la producción de excretas.

A pesar de las importantes ventajas que ofrece el uso de la IA, su práctica no se ha generalizado por igual en los diferentes países, entre otras causas, debido a la dificultad para almacenar semen por períodos prolongados. Por ello, desde principios de la década de los años 80 se ha trabajado en el desarrollo de diluyentes para el semen del cerdo, denominados de "larga duración", de "larga vida" o de "larga conservación" los cuales permiten almacenar el semen fresco por períodos de 4 y hasta 10 días, manteniendo la capacidad fertilizante dentro de niveles apropiados (García 1994). Desde entonces, se han desarrollado más de catorce diluyentes, entre los cuales están los siguientes: SCK-7, Zorlesco, Zornobsa, Zorpva, Reading, Btitschwiler (Modena Modificado), MR-A, Androhep y GEPZ.

Algunos de estos diluyentes ya han comenzado a comercializarse en México, sin referencias en el país, que confirmen sus bondades como conservadores del semen porcino. Además, la información sobre este tipo de conservadores comienza a ser controlada a través de patentes, lo que incrementará la dependencia tecnológica de la industria porcina en México. El presente estudio tuvo como objetivo hacer una evaluación in vitro de los diluyentes Androhep, Reading, Btitschwiler (Modena Modificado) y MR-A, como conservadores de semen porcino por períodos de hasta 5 días a temperaturas de 15 a 18°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el Centro de Mejoramiento Genético y en la granja porcícola "Mariquita", de la Empresa Impulsora Porcícola Llambrís S.P.R. La granja porcícola contaba con una población de 500 cerdas Large White x Landrace (75:25) y se encuentra localizada en la región de la Piedad, Michoacán, bajo un clima templado, con lluvias de verano, para una precipitación pluvial promedio de 772.2 mm/año, y una altura sobre el nivel del mar de 1 775 m. Las coordenadas a informar son las de latitud norte, 19° 20' y longitud oeste, 122° 07'. En este sitio, la temperatura máxima exterior es 38.5°C, con una mínima exterior ascendente a - 3.0°C, y una temperatura media anual igual a 19.1°C. El viento dominante es del NE (Instituto de Geografía 1974).

Se utilizaron los eyaculados de 4 sementales jóvenes (12-14 meses de edad) de la raza Large White. Se colectó la fracción rica mediante la técnica manual, en vasos tipo Berzelius de 350 mL, depositados en recipientes térmicos previamente atemperados a 37° C. El semen se filtró con gasa estéril para separar la porción gelatinosa, e inmediatamente se determinó la motilidad progresiva, la concentración y la morfología espermática. La colección se realizó dos veces por semana, durante 2 meses. La técnica de colección y la evaluación de

características del semen recién colectado, se realizaron de acuerdo con lo descrito por Almond et al (1994). Se realizaron todos los eyaculados independientemente de sus características.

Después de la evaluación inicial, el semen de cada semental se diluyó isotérmicamente en cantidades iguales, en los diluyentes MR-A, Reading, Androhep y Bütschwiler (Modena Modificado), dentro de los 20 minutos posteriores a la colección, se prepararon alícuotas de 100 mL en tasa de dilución variables, con la concentración espermática de 3.5×10^9 . La composición de cada uno de los diluyentes utilizados en este experimento se presenta en la tabla 1; en el caso del MR-A, se utilizó el producto comercial. A todos los diluyentes se le agregó 1 g de lincomicina:espectinomocina (1:2) por litro.

Tabla 1. Composición de cada uno de los diluyentes utilizados en este experimento (g/L)

| Composición | Diluyente | | | |
|---------------------------|----------------|-------|------|-------|
| | A ¹ | B | M | R |
| D-glucosa | 26.0 | 35.0 | + | 11.5 |
| NaCO ₃ H | 1.2 | 1.0 | + | 1.75 |
| EDTA | 2.4 | 2.25 | + | 2.35 |
| Citrato sódico | 8.0 | 6.9 | + | 11.65 |
| BSA, fracción V | 2.5 | 3.0 | - | - |
| Cisteína | - | 0.054 | + | 0.07 |
| Trehalosa | - | - | - | 1.0 |
| APV ² | - | - | - | 1.0 |
| KCl | - | - | - | 0.75 |
| Antibióticos ³ | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Análisis | | | | |
| pH | 6.80 | - | 6.69 | 6.40 |
| Osmolaridad, mOsm | 309 | 284 | 290 | 284 |

¹ A, B, M y R expresan Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading en ese orden

² Alcohol polivinílico del tipo II

³ Lincomicina y espectinomocina (1:2), 1 g/L

El agua utilizada para la dilución se obtuvo por medio de un proceso de destilación, desionización y ósmosis inversa, con una resistencia eléctrica mínima de 1.0 megaohm-cm a 25°C. Además el agua se utilizó inmediatamente después de elaborada. Las dosis de semen así preparadas se evaluaron a las 0, 24, 48, 72, 96, y 120 horas, y las características examinadas fueron: motilidad progresiva, morfología acrosomal y pH. Cada observación se efectuó de manera aleatoria y por la misma persona.

Para determinar la motilidad se tomó una muestra de 3 mL de cada dosis preparada, se incubó en un baño maría a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se evaluó al microscopio con termoplatina regulada a la misma temperatura. La estimación de motilidad fue visual, asignándose porcentajes de 0 a 90 con intermedios de 5 puntos. Para determinar la morfología acrosomal, se tomó 1 mL de semen diluido y se fijó en 1 mL de glutaraldehído al 2%, se evaluó utilizando un microscopio de contraste de fase marca Carl Zeiss, con un objeto Ph 3/100/1.25; según la técnica propuesta por Pursel et al (1972,1974) y Pursel y Johnson (1974) contándose 100 espermatozoides por laminilla. El pH se determinó mediante el uso de un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro Corning con un rango de variación de ± 0.2 .

Análisis biométrico

El análisis biométrico se realizó bajo la metodología de los modelos lineales generalizados (Steel y Torrie 1988), conforme a los siguientes modelos matemáticos:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + C_j + (D.T)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

El modelo se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Modelo general utilizado en el experimento

| Item | Detalle |
|------------------|--|
| Y_{ijk} | Observación de la motilidad progresiva del semen diluido |
| μ | Efecto común de todas las observaciones |
| D_i | Efecto del i-ésimo diluyente, con $i = \text{Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading}$ |
| C_j | Efecto del j-ésimo eyaculado, con $j = 1,2,3,\dots,63$ |
| T_k | Efecto del k-ésimo tiempo de conservación del Semen, con $k = 0,2,3,4,5$ días |
| $(D.T)_{ik}$ | Efecto de la interacción diluyente por tiempo de conservación |
| ϵ_{ijk} | El error experimental, con $\epsilon_{ijk} \sim \text{NID}^*(0, \sigma^2)$ |

Adicionalmente se evaluó el efecto del pH en su componente lineal, sobre la motilidad espermática, conforme al modelo:

$$Y = \mu + B_1X_1 + \epsilon$$

Los detalles del modelo aparecen en la tabla 3.

Tabla 3. Modelo usado para evaluar el efecto del pH

| Item | Detalle |
|------------|---|
| y | Observación de la motilidad progresiva |
| μ | Efecto común de todas las observaciones |
| B_1 | Estimador del coeficiente de regresión parcial para el efecto lineal del pH sobre la motilidad progresiva (X_1) |
| ϵ | Error experimental, con $\epsilon \sim \text{NID}^*(0, \sigma^2)$. |

El modelo de análisis estadístico para evaluar la morfología acrosomal aparece más abajo, y sus detalles aparecen en la tabla 4.

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + C_j + T_k + (D.T)_{ik} + B_1X_1 + \epsilon_{ijk}$$

Tabla 4. Modelo usado para evaluar la acrosomía de los espermatozoides de cerdos

| Item | Detalle |
|------------------|--|
| Y_{ijk} | Observación del porcentaje de acrosomas normales |
| μ | Efecto común de todas las observaciones |
| D_i | Efecto del i-ésimo diluyente, con $i = \text{Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading}$ |
| C_j | Efecto del j-ésimo eyaculado, con $j = 1,2,3,\dots,63$ |
| T_k | Efecto del k-ésimo tiempo de conservación del semen; con $k = 0,2,3,4$ y 5 días |
| $(D.T)_{ik}$ | Efecto de la interacción diluyente x tiempo de conservación |
| B_1 | Estimador del coeficiente de regresión parcial para el efecto lineal de la motilidad sobre NAR (X_1) |
| ϵ_{ijk} | El error experimental, con $\epsilon_{ijk} \sim \text{NID}^*(0, \sigma^2)$ |

De los modelos de análisis se derivaron las medias de mínimos cuadrados por efectos, empleando para la separación

del procedimiento mínimos medios cuadrados (SAS 1986). Adicionalmente se calcularon los coeficientes de correlación lineal simple entre los siguientes parámetros de calidad de semen: motilidad, tiempo de conservación, pH y NAR (Normal Acrosomal Ridge, en inglés).

RESULTADOS

Motilidad espermática

Los resultados del análisis de varianza para motilidad espermática indican que ésta se vio influenciada por el diluyente, eyaculado, tiempo de conservación y por la interacción diluyente x tiempo de conservación (tabla 5), todas con un alto nivel de significación ($P < 0.01$).

Tabla 5. Resultados del análisis de varianza por motilidad espermática

| Fuente de variación | gl | CM |
|------------------------|-------|------------|
| Diluyente | 3 | 18 536.7** |
| Eyaculado | 62 | 1 279.6** |
| Tiempo de conservación | 5 | 4 555.7** |
| Diluyente x tiempo | 15 | 666.0** |
| Error | 1 356 | 158.78 |
| Total | 1 441 | - |
| R^2 | 0.44 | - |

** $P < 0.01$

La motilidad espermática promedio presentada por cada diluyente fue de 57.2, 59.3, 49.2 y 66.6%, para Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading, respectivamente. La motilidad observada por efecto de los eyaculados presentó diferencias entre estos sin presentar una tendencia definida. Con respecto a la variable tiempo, la motilidad espermática disminuyó paulatinamente conforme avanzaba el período de conservación, esto es, los promedios de motilidad espermática más altos se observaron en el momento de la dilución y la más baja a las 120 horas de conservación.

Los efectos de la interacción diluyente x tiempo de conservación sobre la motilidad (tabla 6).

Tabla 6. Medidas de mínimos cuadrados para la motilidad de espermatozoides de cerdos por efecto de la interacción diluyente x tiempo¹

| t^2 | Diluyente | | | |
|-------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | A ² | B | M | R |
| 0 | 66.6 ^{cAB} | 63.8 ^{aA} | 63.3 ^{aA} | 70.3 ^{aB} |
| 24 | 57.2 ^{bAB} | 58.6 ^{bA} | 53.1 ^{bB} | 66.2 ^{abC} |
| 48 | 55.8 ^{bA} | 58.8 ^{bA} | 48.4 ^{cB} | 67.1 ^{abC} |
| 72 | 54.7 ^{bA} | 59.0 ^{bA} | 49.0 ^{bcB} | 66.9 ^{abC} |
| 96 | 53.2 ^{bA} | 58.0 ^{bB} | 41.9 ^{cC} | 63.4 ^{bD} |
| 120 | 55.4 ^{bA} | 57.8 ^{bA} | 39.2 ^{dB} | 65.6 ^{bc} |

¹ $EE \pm 1.6$ ($P < 0.05$)

² A, B, M y R expresan Androhep, Bütschwiler, MR-A Reading en ese orden

³ Tiempo expresado en horas de conservación

^{abcd} Medias en la misma fila sin letra en común difieren entre sí significativamente ($P < 0.05$)

^{ABCD} Medias en la misma columna sin letra en común difieren entre sí significativamente ($P < 0.05$)

Los datos indican que al momento de la dilución (hora 0) el Reading tuvo motilidades superiores con respecto a los otros tres diluyentes, aunque sin diferencias estadísticamente

significativas ($P>0.05$) en relación con el Androhep, Bütschwiler y MR-A, que no presentaron diferencias estadísticas a las 0 horas. En el resto de los períodos de conservación (de 24 a 120 horas), el Reading fue significativamente ($P<0.05$) superior a los demás diluyentes; en tanto que el Androhep y Bütschwiler se comportaron de forma similar en estos períodos, mientras que el diluyente con motilidad más baja fue el MR-A, con diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$).

En general existió una tendencia a disminuir los porcentajes de motilidad para todos los diluyentes conforme progresó el período de conservación, con el marcado descenso en los promedios a las 24 horas. En particular, el Androhep y el Bütschwiler sostuvieron la motilidad entre las 24 y 120 horas, y el mismo comportamiento fue observado en el Reading. Por su parte el MR-A exhibió una disminución más notable al avanzar dicho período.

pH

Se encontraron efectos altamente significativos ($P<0.01$), de un pH lineal sobre la motilidad espermática (tabla 7). En general al avanzar el período de conservación el pH tendió a cambiar hacia los estados de alcalinidad, observándose en ésta menores promedios de motilidad.

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza para motilidad por efecto de pH

| Fuente de variación | gl | CM |
|---------------------|-------|------------|
| pH | 1 | 58 838.5** |
| Error | 1 440 | 221.9 |
| Total | 1 441 | - |
| R ² | 0.15 | - |

** $P<0.01$

En la tabla 8 se presentan los coeficientes de regresión parcial por el efecto lineal del pH sobre la motilidad espermática, cuyos valores establecen que por cada unidad de incremento en el pH, la motilidad se disminuye en un 35.2, 28.1, 67.4 y 22.9% para los diluyentes Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading, respectivamente. Lo anterior manifiesta que el MR-A fue el diluyente que más se afectó negativamente con respecto a la motilidad espermática por efecto del pH.

Tabla 8. Modelo de regresión de pH sobre motilidad espermática en semen de cerdos. Efecto del diluyente

| | Diluyente | | | | General |
|----------------|----------------|--------|--------|--------|---------|
| | A ¹ | B | M | R | |
| a | 305.4 | 263.6 | 550.9 | 225.9 | 271.3 |
| b | - 35.2 | - 28.1 | - 67.4 | - 22.9 | - 22.9 |
| R ² | 0.03 | 0.03 | 0.14 | 0.05 | 0.15 |

¹ A, B, M y R expresan Androhep, Bütschwiler, MR.A y Reading en ese orden

Morfología acrosomal

A excepción de la interacción diluyente x tiempo de conservación, el resto de las variables incluídas en el análisis de varianza presentaron influencia altamente significativa ($P<0.01$), sobre la morfología acrosomal normal (NAR). Los promedios obtenidos en morfología acrosomal normal (NAR)

por cada diluyente establecen que el Androhep presentó los mejores promedios de NAR, seguido por el MR-A y finalmente el Bütschwiler y Reading, aunque no existieron diferencias estadísticas ($P>0.05$) entre ellos.

Tabla 9. Resultado del análisis de varianza para la morfología acrosomal normal

| Fuente de variación | gl | CM |
|------------------------|-------|-------------|
| Diluyente | 3 | 192.9** |
| Eyaculado | 62 | 228.9** |
| Tiempo de conservación | 5 | 10 192.78** |
| Diluyente x tiempo | 15 | 12.69 |
| Mortalidad | 1 | 82.82** |
| Error | 1 346 | - |
| Total | 1 432 | - |
| R ² | 0.84 | - |

** $P<0.01$

Con respecto a la interacción diluyente x tiempo de conservación, las medidas de mínimos cuadrados muestran que el Androhep y el MR-A tuvieron un comportamiento similar, y solamente fueron diferentes estadísticamente ($P<0.05$) en las 120 horas de conservación; mientras que el Bütschwiler fue diferente a las 0, 48 y 120 horas, con respecto al Androhep. Por su parte el Reading presentó diferencias estadísticas ($P<0.05$) en todos los períodos de conservación, con respecto al Androhep (tabla 10).

En lo concerniente a la variable del tiempo, el porcentaje de los acrosomas normales descendió gradualmente todos los días de preservación dentro de cada diluyente. En particular, el diluyente Androhep presentó los más altos promedios de NAR (acrosomas normales), seguidos por el MR-A y Bütschwiler y finalmente, las menores tasas las registró el Reading.

Tabla 10. Medias de mínimos cuadrados para el porcentaje de acrosomas normales¹ en semen líquido de cerdos

| t ² | Acrosomas normales, % | | | |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | A ³ | B | M | R |
| 0 | 95.7 ^{aA} | 93.9 ^{aB} | 94.7 ^{aAB} | 94.1 ^{aB} |
| | ± 0.40 | ± 0.40 | ± 0.40 | ± 0.41 |
| 24 | 91.5 ^{bA} | 91.7 ^{bAB} | 90.5 ^{bAB} | 90.1 ^{bB} |
| | ± 0.40 | ± 0.40 | ± 0.40 | ± 0.40 |
| 48 | 87.3 ^{cA} | 85.7 ^{cB} | 86.8 ^{cAB} | 85.9 ^{cB} |
| | ± 0.41 | ± 0.41 | ± 0.42 | ± 0.42 |
| 72 | 83.3 ^{dA} | 82.9 ^{dAB} | 82.8 ^{dAB} | 81.9 ^{d2} |
| | ± 0.40 | ± 0.40 | ± 0.40 | ± 0.40 |
| 96 | 80.2 ^{eA} | 79.6 ^{eA} | 79.8 ^{eA} | 78.4 ^{eB} |
| | ± 0.40 | ± 0.39 | ± 0.41 | ± 0.40 |
| 120 | 78.3 ^{fA} | 75.8 ^{fB} | 77.0 ^{fC} | 75.0 ^{fB} |
| | ± 0.41 | ± 0.41 | ± 0.43 | ± 0.41 |

¹ Acrosomas normales equivale a NAR, siglas en inglés de Normal Plical Ridge

² Tiempo expresado en horas de conservación

³ A, B, M y R expresan Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading en ese orden

⁴ Error estándar

^{abcdef} Medias sin letra en común en la misma columna difieren significativamente ($P<0.05$) entre sí

^{ABC} Medias sin letra en común en la misma fila difieren significativamente ($P<0.05$) entre sí

En la tabla 11 se muestra que existió una correlación negativa, significativa ($P<0.01$), entre el pH y la motilidad, es decir, a medida que el pH se incrementa, la motilidad espermática

disminuye; mientras que la motilidad y el porcentaje de acrosomas normales (NAR) solo tuvo una débil correlación positiva, lo cual expresa que conforme el promedio de acrosomas normales incrementa, también la motilidad espermática se aumenta.

Tabla 11. Correlaciones entre parámetros de calidad de semen de cerdos

| | TC | M | AN | pH |
|----|-------|----------|----------|----------|
| TC | 1.000 | -0.228** | -0.812** | 0.055* |
| M | | 1.000 | 0.158** | -0.394** |
| AN | | | 1.000 | -0.008 |
| pH | | | | 1.000 |

* P<0.05; ** P<0.01

TC, M y AN expresan tiempo de conservación, motilidad y acrosomas normales en ese orden

DISCUSION

Motilidad espermática y pH del semen diluido

Los porcentajes de motilidad con semen diluido obtenidos en este trabajo son en general inferiores, a los encontrados en otras investigaciones en las que se estudiaron los diluyentes Androhep, MR-A y Reading (Revell y Glossop 1989; Waberski et al 1990; Waberski et al 1994; Laforest y Allard 1995). Sin embargo, la tendencia es análoga en los cuatro diluyentes en cuanto a que existe una disminución gradual de la motilidad espermática conforme avanza el período de conservación.

El comportamiento respecto al descenso en la motilidad del semen conservado, ha sido asociado con diversos factores tales como el proceso mismo de dilución, el cual ocasiona una reducción en el número de espermatozoides móviles con cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, los que a su vez provocan pérdidas de los lípidos, principalmente fosfatidil-serina, la cual actúa protegiendo a los espermatozoides contra los efectos adversos del frío y mantiene mayores porcentajes de motilidad (Benson et al 1967; Butler y Roberts 1975; Weitze y Petzoldt 1992).

Otro factor implicado en la reducción de la motilidad espermática es la anaerobiosis, condición utilizada en la preservación de espermatozoides, donde éstos sobreviven en ausencia de oxígeno, gracias a la capacidad que tienen de convertir la fructosa en ácido láctico mediante una vía metabólica oxidativa (Aalbers et al 1961). En este estado la motilidad observada es baja, probablemente debido a que el patrón de utilización de la fructosa es también reducido (Foley et al 1964). Estudios más recientes indican que el lactato resultante de la fructólisis tiene importantes correlaciones con la motilidad espermática total (Rigau et al 1996), y que puede actuar como un inhibidor de la misma (Carr y Acott 1989). De esta forma la glucosa que contienen los diversos medios de conservación, también es oxidada por los espermatozoides por la vía glucolítica. Bedford y Hoskins (1990) han apuntado que ésta es la vía ampliamente utilizada por los espermatozoides de los mamíferos.

Dacheux et al (1979), señalaron que la motilidad no es alterada por los cambios de pH, en períodos de incubación de 30 minutos. Contrariamente Gatti et al (1993) expusieron que el pH del medio externo actúa regulando el pH intracelular, observándose una relación lineal entre ambos. Asimismo el pH externo puede actuar negativamente en la preservación de la motilidad en períodos de incubación de 60 minutos, específicamente en niveles de pH alcalino. Por lo anterior, es

posible asumir que a medida que se incrementa el tiempo de conservación de los espermatozoides, los efectos del pH sobre la motilidad se hacen más evidentes.

Los resultados de la presente investigación indican, que el Reading no solo alcanzó motilidades superiores al resto de los diluyentes evaluados, sino también logró conservarlas hasta el quinto día; éste último coincide con lo observado por Revell y Glossop (1989), quienes encontraron el máximo de motilidad espermática durante los primeros seis días de conservación. La alta viabilidad espermática en términos de motilidad progresiva observada en este diluyente pudiera explicarse por su interacción con el pH, el cual fue ligeramente ácido (6.9). Estos resultados concuerdan con lo referido por Steinbach y Foote (1966) y Watson (1990), los cuales señalaron que diluyentes con este promedio de pH obtienen un metabolismo celular menos activo, con lo que se logran mejores motilidades. Papioli (1986) ha mencionado que en pH alcalino, la actividad glucolítica de los espermatozoides es mayor y estos desgastan más rápidamente, disminuyendo su longevidad.

Por su parte, el Androhep y el Bütschwiler, que tuvieron un pH ligeramente alcalino, presentaron motilidades semejantes ente sí e inferiores al Reading, lo cual coincide con lo encontrado por Papioli (1986) y Gatti et al (1993). La composición de estos dos diluyentes presentan diferencias, pero principalmente en el tipo de amortiguadores utilizados. Así el Androhep contiene Hepes y el Bütschwiler posee Tris. Ambos amortiguadores orgánicos. Además el Bütschwiler tiene también ácido cítrico. De los resultados se puede deducir que el sistema de amortiguamiento del Bütschwiler es tan eficiente como el utilizado por el Androhep, sólo que el primer diluyente es más barato. Por su parte el Reading contiene los mismos amortiguadores que el Bütschwiler, fundamentalmente con una mayor cantidad de citrato sódico, lo cual probablemente cause los valores de pH ligeramente ácidos de aquel diluyente. A su vez, el semen diluido en MR-A presentó cifras para el pH más alcalinas (7.4), los cuales afectaron de manera negativa la motilidad progresiva durante el período de conservación. En este sentido, tanto los diluyentes Androhep, MR-A y Reading logran conservar pH estables de las 24 a las 120 horas de conservación. Sin embargo, el MR-A presentó las motilidades más bajas.

Morfología acrosomal

Los resultados del presente estudio muestran claramente que existe una disminución en la proporción de acrosomas normales (NAR; Normal Apical Ridge), al avanzar el período de conservación, del 95% a las 0 horas, hasta 76% a las 120 horas. Estudios previos coinciden con la tendencia observada en esta investigación (Pérez et al 1991; Martínez et al 1992; Waberski et al 1994; Laforest y Allard 1995; Althouse 1997).

Estos valores de NAR son comunes encontrarlos cuando el semen se conserva de 15 a 18°C, en donde si bien existe cierto estrés térmico, éste no es tan elevado como sucede con la refrigeración a 5°C, en cuyo caso las tasas de NAR descienden inmediatamente de manera impresionante (Pursel 1972), lo cual manifiesta la alta sensibilidad de los espermatozoides para adherirse a la zona pelúcida y consecuentemente el número de cerdas preñadas y de óvulos fertilizados se reduce sustancialmente (Saacke et al 1968; Pursel et al 1972).

Los altos promedios de morfología acrosómica normal encontrados en este trabajo pudieran estar influenciados positivamente por el uso únicamente de la fracción rica de los

eyaculados, lo cual ha sido fundamentado por estudios que comparan la morfología de los acrosomas normales de eyaculados con la fracción rica contra eyaculados completos, presentando los primeros valores superiores en morfología acrosómica normal (Pursel et al 1972).

Respecto al pH de los diluyentes y su influencia en la morfología acrosomal, se ha informado que un medio alcalino durante la conservación podría alterar la morfología de las membranas, así como la conservación de poacrosina (Cidoncha et al 1994).

Los cuatro diluyentes evaluados en el presente trabajo, tienen la capacidad de conservar elevadas tasa de espermatozoides con NAR (Normal Apical Ridge), y por lo tanto de mantener la capacidad fertilizante hasta el quinto día de vida; no obstante el Androhep y MR-A fueron mejores que los otros diluyentes restantes.

Sin embargo, el comportamiento encontrado en morfología del acrosoma para cada uno de los diluyentes, fue diferente al de la motilidad; es decir al combinar estas dos variables, se observa que el diluyente que mostró las mejores tasas de motilidad, presentó los peores promedios de normalidad acrosómica. Estos resultados indican que estas variables son independientes entre sí, siendo éste una limitante como criterios de evaluación de calidad de semen. Precisamente por esto, son variables que se complementan y ambas proporcionan una valoración más objetiva de la calidad del eyaculado fresco ó incubado en un medio artificial para su conservación. Es decir, la motilidad progresiva es un criterio insuficiente para evaluar la calidad de los eyaculados cuando se utiliza solamente como criterio único. Pero cuando se complementa con la morfología del acrosoma existe una evaluación más objetiva; aunque en ocasiones los valores de ambas pruebas no coinciden, como es el caso del presente trabajo. Por ello, es necesario continuar desarrollando una prueba in vitro rápida, barata y exacta, con posibilidades de predecir la capacidad fertilizante del espermatozoide, en trabajos de campo.

Adicionalmente de acuerdo con Anzar y Gram (1996), la tonicidad de los diluyentes también pudiera haber influido en la disimilitud de los resultados de motilidad y morfología del acrosoma, lo cual se sustenta con estudios que han encontrado que los diluyentes hipercrosómicos disminuyen la motilidad sin afectar negativamente la morfología acrosomal; sin embargo, este aspecto no fue estudiado en el presente trabajo.

Las tasas de motilidad espermática fueron bajas en los cuatro diluyentes, siendo el Reading el que mejores resultados produjo, seguido del Bütschwilier, Androhep y MR-A, en este orden, mientras que Androhep y el MR-A lo fueron para conservar la morfología del acrosoma normal, por lo que se concluye que los medios ligeramente ácidos favorecen la mortalidad espermática, en tanto que la morfología acrosómica se mostró independiente del pH.

REFERENCIAS

Aalbers, J.G., Mann, T. y Polge, C. 1961. Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2:42-53

Almond, G., Britt, J., Carr, J., Flowers, B., Glossop, Ch., Morrow, M. y See, T. 1994. *The Swine AI Book* (Ruth Cronje, editora). North Carolina State University Press. Raleigh, pp

Althouse, G.C. 1997. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. In: *Compendium on Continuing Education*, 19:777-782

Anzar, M. y Graham, E.F. 1996. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. *Theriogenology*, 45:513-520

Bedford, J.M. y Hosking, D.D. 1990. *The Mammalian Spermatozoon: Morphology, Biochemistry and Physiology*. In: *Marshall's Physiology of Reproduction* (G.E. Lamming, editor). 4th edition. Churchill Livingstone, p 379-568

Benson, R.W., Pickett, B.W., Komarek, R.J. y Lucas, J.J. 1967. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and the relationship to lipid content. *Journal of Animal Science*, 26:1078-1081

Butler, W.J. y Roberts, T.K. 1975. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *Journal of Reproduction and Fertility*, 43:183-187

Carr, D.W. y Acott, T.S. 1989. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biology of Reproduction*, 41:907-920

Cidoncha, E.S., De Alba, C., Marigorta, P., Corchera, B.D. y Rillo, S.M. 1994. Estudio de la calidad de semen de verraco a través de la evaluación de parámetros bioquímicos. *Revista Anaporc (Madrid)*, 21:57-76

Dacheux, J.L., O'Shea, T. y Paquignon, M. 1979. Effects of osmolality, bicarbonate and buffer on the metabolism and motility of testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa of boars. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55:287-296

Flowers, W.L. 1996. Performance expectations of different mating systems. In: *Allen D. Leman Swine Conference*. St Paul, 23:63-66

Foley, C.W., Heidenreich, C.J., Harrington, R.B., Jones, H.W. y Erb, R.E. 1964. Changes in fructose, lactic acid, pH and motility of boar semen during incubation at 37°C. *Journal of Animal Science*, 23:558-561

García, R.J. 1994. Improvement in reproductive performance in pigs with artificial insemination and MR-A long term preservation diluent. In: *25th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*. Chicago, p 1-5

Gatti, J.L., Chevrier, C., Paquignon, M. y Dacheux, J.L. 1993. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98:439-449

Instituto de Geografía. 1974. *Geografía del Estado de Michoacán*. Morelia, pp

Laforest, J.P. y Allard, D. 1995. Comparison of two extenders for long-term storage of fresh boar semen. In: *Third International Conference on Boar Semen Preservation*. Mariensee, p 255-256

Martínez, M.C., Becerril, A.J., Conejo, N.J., Navarro, F.R. y Soto, F.M.A. 1992. Motilidad y morfología acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en los diluyentes

GEPZ y BTS. In: XXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC). Acapulco, p 91-94

Papioli, G.C. 1986. Comprobación de diferentes diluyentes para la conservación de semen de verraco refrigerado a 15° C. Anaporc (Madrid), 6:95-103

Pérez Marcos, C., Sánchez, R., Palacio, M., Pursel, V.G., Pérez, T. y Rillo, S.M. 1991. Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 15° C. *Reproduction of Domestic Animals*, 26:112-116

Pursel, V.G., Johnson, L.A. y Rampacek, G.B. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated in cold show. *Journal of Animal Science*, 34:278-283

Pursel, V.G., Johnson, L.A. y Schulman, L.L. 1974. Acrosome morphology of boar spermatozoa during in vitro aging. *Journal of Animal Science*, 38:113-116

Pursel, V.G. y Johnson, L.A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1:63-68

Revell, S.G. y Glossop, C.E. 1989. A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Animal Production*, 48:579-584

Rigau, T., Piedrafita, J., Reverter, A., Canal, M. y Rodríguez-Gil, J.E. 1996. The rate of L-lactate production: as feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Animal Reproduction Science*, 43:161-172

Rillo, S.M., Sánchez, R.S., Casado, P.G. y Arteaga, C.G. 1993. Técnicas de contrastación de semen de verraco. *Revista Anaporc (Madrid)*, 128:5-16

Saacke, R.G., Amann, R.P. y Marshall, C.E. 1968. Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls. *Journal of Animal Science*, 27:1391-1400

SAS.1986. User's Guide (version 6.03) Statistical Analysis System (SAS) Institute Company In Company. Cary, versión electrónica disponible en disco compacto

Steel, R.G.D. y Trrie, J.H.1988. Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw Hill Book Company In Company. México, Distrito Federal, p 27-28

Steinbach, J. y Foote, R.H. 1966. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 50:205-212

Waberski, D., Weitze, K.F., Meding, S., Leiding, C. y Weiskopf, S. 1990. The sperm compatibility of lincospectin solution (Upjohn) as an antibiotic additive in liquid boar semen. In: 11th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Lausanne, p 26

Waberski, D., Weitze, K.F., Litmann, C.W., Lübbert zur Lage, F.P., Bortolozzo, Willmen, T. y Ptzoldt, R. 1994. The initial fertilizing capacity of long term-stored liquid boar semen following pre-and postovulatory insemination. *Theriogenology*, 41:1367-1377

Watson, P.F. 1990. Artificial Insemination and the Preservation of Semen. In: Marshall's Physiology in the Male, p 778-784

Weitze, K.F. y Petzoldt, R. 1992. Preservation of semen. *Animal Reproduction Science*, 28:229-235