

EVALUACION IN VITRO E IN VIVO DE SEMEN PORCINO CONSERVADO EN DILUYENTES DE LARGA DURACION

G. Ochoa y R. Ortega

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia. Michoacán, México
email: rortega9_@hotmail.com

RESUMEN

El semen de verraco puede ser preservado in vitro en forma líquida o congelada. El uso de semen congelado continúa siendo muy limitado con respecto al de semen fresco diluido, debido principalmente a su baja fertilidad, como consecuencia de su sensibilidad al frío y a un mayor costo por cada cerda que llega a parir.

En el presente texto se revisan los principios básicos para la dilución de semen de cerdos en diluyentes de larga duración, las características físico-químicas de los diluyentes así como su composición química. Además, se hace un recuento de la capacidad fertilizadora del semen porcino conservado en diluyentes de larga duración.

De acuerdo con la presente revisión, los diluyentes Reading, Androhep y MR-A son los que parecen tener un mejor comportamiento, tanto in vitro como en pruebas de campo y se convierten en los candidatos de elección para ser estudiados, bajo las condiciones de México. Además, un diluyente que goza de amplia aceptación en México, particularmente en los centros de inseminación artificial en la región de "El Bajío" es el Bütschwiler o Modena Modificado, al cual por su comportamiento se le puede clasificar también como un diluyente de larga duración. Sin embargo, no existe información suficiente que confirme tales características.

Palabras claves: cerdo, semen, conservación, diluyente

Título corto: Conservación de semen porcino

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF PIG SEMEN PRESERVED WITH LONG TERM DILUENTS

SUMMARY

Boar semen may be preserved in vitro either in liquid or frozen state. The use of frozen semen remains to be very limited with respect to diluted fresh semen, mainly due to its low fertility, as a consequence to its sensitivity to cold and to a major cost per farrowing sows.

In the current text basic principles for dilution of pig semen in long term diluents are reviewed, as well as its physico-chemical characteristics and chemical composition. Moreover, a review of the fertilizing capacity of pig semen preserved in diluent of long term length is reviewed.

According to the present review, Reading, Androhep and MR-A diluents are those showing a better performance, either in vitro or in on farm tests and become candidates to be selected for studies under Mexican conditions. Besides, Bütschwiler or Modena Modified is greatly accepted in Mexico, particularly in those centres of artificial insemination located in "El Bajío", which from the point of view of its performance can be classified as a long term length diluent. However, there are not enough information to confirm these characteristics as yet.

Key words: pig, semen, conservation, diluent

Short title: Conservation of pig semen

Tabla de contenido

Introducción, 299
Principios básicos para dilución de semen porcino en diluyentes de larga duración, 299
Características físico-químicas de los diluyentes, 299
Composición química de los diluyentes de larga duración, 300
Capacidad fertilizadora de los espermatozoides conservados en diluyentes de larga duración, 301
Conclusiones, 303
Referencias, 303

INTRODUCCION

El semen de verraco puede ser preservado in vitro en forma líquida o congelada (Paquignon y Courot 1981). El uso de semen congelado continúa siendo muy ~~DILUYENTES~~ respecto al de semen fresco diluido, debido principalmente a su baja fertilidad, como consecuencia de su sensibilidad al frío (Hooper et al 1986; Rodríguez y Eriksson 1994) y a un mayor costo por cada cerda que llega a parir.

El estrés por frío produce los siguientes efectos: reducción en el número de espermatozoides móviles; liberación de enzimas, movimiento de iones a través de las membranas; pérdida de lípidos, especialmente fosfolípidos (Weitze y Petzoldt 1992) y alteraciones del ADN. Todo lo cual probablemente explique por qué la fertilidad y el desarrollo embrionario son afectados negativamente, cuando se usa semen congelado. Adicionalmente, el período de inseminación para obtener una fertilidad óptima usando semen congelado parece ser más corto (Weitze y Waberski 1994), y cada colección rinde menos dosis que con semen fresco (Crabo y Dial 1992).

La gran sensibilidad al frío de los espermatozoides del cerdo impide que sean almacenados a temperaturas por debajo de los 15°C y consecuentemente, es difícil reducir su actividad metabólica y por el contrario se facilita el crecimiento de los microorganismos (Weitze y Petzoldt 1992). Finalmente, los métodos de criopreservación actualmente no son los más adecuados para la producción porcina comercial. Por esto, el uso de semen líquido conservado a temperaturas de 15-18°C, continúa siendo el método de elección para la inseminación artificial porcina.

PRINCIPIOS BASICOS PARA LA DILUCION DEL SEMEN PORCINO EN DILUYENTES DE LARGA DURACION

La mezcla de semen con un diluyente, permite mantener y proteger a los espermatozoides, y conservar su fertilidad hasta que son utilizados en la inseminación. Otra función de los diluyentes, es la de aumentar el volumen total, de tal manera que la dosis pueda ser manejada convenientemente (Salisbury et al 1978). La función de un diluyente ha sido definida por Reed (1990) como "ser capaz de sostener a los espermatozoides en estado viable, por un período de tiempo variable, para proporcionar la aptitud de fertilización en una alta proporción de óvulos, con un mínimo de dosis de esperma, al mínimo costo y riesgo de salud".

En general, para mantener un máximo de viabilidad espermática durante la dilución y conservación, deben tomarse en cuenta la osmolaridad, el pH, la temperatura y la fuerza iónica, de tal manera que las diferencias de estos factores entre el semen y la solución preservadora sean mínimas. Adicionalmente, la composición del diluyente debe proveer de un sustrato de energía, de sustancias amortiguadoras y generalmente se le agregan agentes antimicrobianos (Watson 1990). Un elemento que igualmente debe ser considerado es la calidad del agua ya que a pesar de ser el mayor constituyente de un diluyente, se le ha dado poca importancia. Asimismo, otros atributos que deben poseer los diluyentes, son su fácil preparación, que permanezcan estables y sean económicos.

CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LOS DILUYENTES

Fuerza iónica. Los espermatozoides de verraco tienen una mejor sobrevivencia en diluyentes con relativamente baja fuerza iónica, lo cual puede reflejar la importancia de las proteínas ligadoras de superficie las cuales son más fácilmente solubilizadas en medios con alta fuerza iónica (Watson 1990). Además, el plasma seminal tiene una alta concentración iónica que es estimulante del metabolismo celular y por este motivo se colecta únicamente la fracción rica del eyaculado (Rillo 1982).

Osmolaridad. Algunos diluyentes utilizados para la preservación de semen a largo plazo son hipertónicos (370-380 mOsmol) con respecto al plasma seminal (304 ± 7 mOsmol/kg) según Schilling y Vengust (1986), ya que bajo estas condiciones el espermatozoide se deshidrata ligeramente y supuestamente se conserva mejor. Contrariamente, algunos trabajos establecen que la motilidad espermática se preserva mejor en diluyentes ligeramente hipotónicos, mientras que en otros, se indica que la fertilidad es superior en medios isotónicos (Stevermer et al 1964; Dacheux et al 1979).

Los espermatozoides actúan como osmómetros ideales, es decir, el volumen de la célula espermática cambia linealmente como el recíproco de la osmolaridad (tonicidad) del medio o solución externa (Du et al 1994); ésto es especialmente verdadero entre osmolaridades de 210 a 1 500 mOsmol. Así que las alteraciones de la integridad morfológica y funcional espermática se producen en rangos diferentes a los antes mencionados, ésto es cuando la tonicidad se desvía considerablemente de la de los espermatozoides (Salisbury et al 1978) ó por cambios bruscos de presión osmótica, como cuando se someten a la congelación (Rodríguez et al 1995).

pH. No obstante su importancia, el pH del semen porcino conservado en diluyentes de corta y larga duración, prácticamente no está estudiado. En bovinos, el metabolismo propio de los espermatozoides genera metabolitos ácidos que crean una autointoxicación, por lo que requieren un mecanismo de protección frente a ésta; por ello se utilizan los amortiguadores ó sustancias "buffer", ya sea como componentes menores para el control del pH o como componentes mayores que proporcionan tanto capacidad de tonicidad como de amortiguación (Salisbury et al 1978).

La generalidad de los diluyentes son amortiguados con pH entre 6.4 a 6.8 (Steinbach y Foote 1966; Watson 1990), ya que en medios ligeramente ácidos el metabolismo celular es menos activo; además se produce la disociación del bicarbonato en CO₂ que actúa como inhibidor del metabolismo oxidativo (Salisbury et al 1978).

Temperatura. Se sabe que los espermatozoides de verraco son altamente sensibles al frío, especialmente a temperaturas por debajo de 15°C, así como también, a los cambios bruscos de la misma. Por esto la dilución debe realizarse en condiciones isotérmicas (Flowers 1996b), ésto es, la temperatura del semen y la del diluyente deben ser idealmente iguales. Asimismo, y de acuerdo con García (1994) y Pedersen y Borge (1995), la temperatura al momento de la dilución deberá ser superior a 30°C; de la misma manera la disminución de ésta a 15-18°C, tendrá que realizarse lentamente durante un lapso de 3 a 5 horas (García 1994).

COMPOSICION QUIMICA DE LOS DILUYENTES DE LARGA DURACION

Amortiguadores. Entre las sustancias amortiguadoras se encuentran el citrato de sodio y el bicarbonato de sodio (Cheng 1988). Más recientemente se han incorporado amortiguadores orgánicos como el TRIS, tris-hidroximetil aminometano; el MOPS, ácido 2-N-morfolino etanosulfónico y el HEPES, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico. Estos compuestos han aportado amplias posibilidades de acción amortiguadora, ya que pueden combinarse y titularse en rangos más amplios de pH y osmolaridad que son relativamente inocuos para los espermatozoides (Salisbury et al 1978).

Azúcares Los azúcares más comunes que se agregan a los diluyentes, son la fructosa y la glucosa, siendo generalmente esta última la más utilizada. La inclusión de azúcares en los diluyentes para semen puede desempeñar diferentes funciones. Se emplean como fuente de energía, ya que las células espermáticas la requieren para su motilidad y conservación y aunque los espermatozoides presentan metabolismo propio, lo que se intenta es proteger sus reservas intracelulares (Salisbury et al 1978). Además, contribuyen a la osmolaridad del diluyente, ejerciendo una fuerza osmótica sobre la membrana celular del esperma, dependiendo de su permeabilidad (Watson 1990). Otro azúcar usado es la trehalosa, un disacárido que está presente en la naturaleza en altas concentraciones en algunos organismos poiquilotermos, tolerantes al frío (nematodos que habitan el suelo y levaduras). La trehalosa puede desempeñar un papel protector de los espermatozoides contra el frío (Rudolph y Crowe 1985; citados por Revell y Glossop 1989).

Proteínas. La albúmina sérica bovina (BSA, siglas en inglés), es una proteína empleada para aislar subpoblaciones de espermatozoides con alta motilidad, y por lo tanto con alta calidad. De esta forma se mejora la capacidad de fertilización o bien se requieren pocos espermatozoides para una fertilidad normal (Dixon et al 1980; Estienne et al 1989). Se admite que la BSA tiene un efecto de estimulación y mantenimiento de la motilidad y que posee una alta capacidad de combinación con muchos productos metabólicos (Weitze 1990). Se ha informado que también tiene una propiedad antioxidante e inactiva los subproductos del metabolismo espermático y bacteriano, así como ser un sustrato energético (Renard et al 1995).

Aminoácidos. A algunos diluyentes producidos con base en subproductos lácteos, se les ha agregado la cisteína, para obviar la necesidad de hervir la leche e inactivar un factor tóxico, la lactenina. Sin embargo este aminoácido se ha incorporado aún en ausencia de leche, sin justificación aparente (Watson 1990). Quizá su incorporación se deba al hecho de que es un elemento abundante en las protaminas (proteínas básicas), las cuales proporcionan un grado de condensación estable de la cromatina, parámetro valioso en la maduración espermática y el desarrollo embrionario (González-Chabbarri y Rillo 1994).

Agentes microbianos. Debido a que tanto agentes patógenos exógenos como la microflora propia del divertículo prepucial, uretra y pene pueden afectar negativamente la fertilidad del semen, es necesaria la inclusión de antibióticos en los diluyentes. La flora bacteriana produce toxinas, y éstas a su vez, putrefacción de los componentes de origen biológico del diluyente. Algunos de los antibióticos más utilizados son; penicilina, estreptomina, lincomicina, espectinomina, gentamicina, polimixina B, et cetera. También se han incluido modernos antibióticos como la amikacina y la dibekacina, este

último se ha señalado como de mayor efectividad en la inhibición del crecimiento bacteriano, sin afectar la motilidad y morfología acrosomal (Cheng 1988). Recientemente se ha admitido que el ceftiofur sódico además de suprimir el crecimiento bacteriano, no posee efectos espermicidas (Guilmoto y Rigault 1996).

Otros compuestos y aditivos. Muchos de los diluyentes de larga duración contienen agentes protectores como el EDTA (ácido etilendiamino tetra acético). Este compuesto desempeña un papel quelatante para iones divalentes, limitando el movimiento a través de la membrana plasmática, lo cual ocurre con la dilución y el enfriamiento (Salisbury et al 1978; Watson 1990). El EDTA, también protege contra la aminoácido-oxidasa liberada por los espermatozoides muertos. Adicionalmente se ha demostrado que puede estimular y mantener una mayor motilidad del eyaculado o de espermatozoides porcinos lavados (Juang et al 1990).

Una sustancia denominada alcohol polivinílico (PVA, siglas en inglés) se ha empleado como sustituto de la BSA, para el mantenimiento de la motilidad, la morfología acrosomal y la capacidad de fertilización de espermatozoides de verraco almacenados in vitro a 15°C (Cheng 1988).

En ocasiones algunos estimulantes del metabolismo son incluidos dentro de los diluyentes de larga duración, tal es el caso de la cafeína, la cual estimula la motilidad espermática, aunque dicha actividad sólo es temporal (Watson 1990).

Agua. Aunque el agua constituye el mayor elemento de un diluyente, ha tenido poca consideración. Actualmente no se encuentran cabalmente delimitadas las pautas de su calidad; sin embargo se ha encontrado que al comparar el uso de diversas fuentes de ésta, el agua con un pre-tratamiento por medio de un sistema de ósmosis inversa, produjo los más altos índices de motilidad en espermatozoides de hámster (Bavister y Andrews 1988).

En general, en los Estados Unidos de América, la calidad de agua se clasifica en tres clases: tipo I, que es de la más alta pureza y se obtiene por una combinación de desionización, destilación, filtración y ósmosis inversa; tipo II, es producida por doble destilación y tipo III, que se elabora por simple destilación. En un estudio realizado con diluyentes de corto plazo preparados en los tres tipos de agua, mencionados anteriormente, se presentaron los promedios más altos de viabilidad y fertilidad en los tipos I y II, cuando el período de conservación fue mayor a tres días, mientras que cuando el período de preservación fue en el lapso de los tres días postcoleción, los parámetros de viabilidad y fertilidad, no se afectaron significativamente, con ninguno de los tres tipos de agua (Flowers 1996a, 1998). Lo anterior puede evidenciar que cuando se va a conservar el semen por períodos prolongados (más de 72 horas), la calidad del agua resulta fundamental.

Además de la fuente de agua, otro factor que puede influir en la calidad de la misma, es el tiempo de conservación de ésta, ya que con diluyentes preparados con el agua que es utilizada inmediatamente después de su elaboración, se producen mayores tasas de concepción con respecto al agua que es mantenida almacenada varios días y sin abrir, tanto en garrafones de plástico como de vidrio (Galber et al 1983). En consecuencia, para maximizar las propiedades de conservación, el agua usada para la dilución debe ser empleada rápidamente después de su elaboración.

En el anexo 1 se presenta la composición química de algunos diluyentes de larga duración, así como sus propiedades fisico-químicas.

CAPACIDAD FERTILIZADORA DE LOS ESPERMATOZOIDES CONSERVADOS EN DILUYENTES DE LARGA DURACION

Los principales diluyentes considerados dentro del grupo de larga duración, son: SCK-7, Zorlesco, Modena, Bütschwiler, MR-A, Zorpva, Reading, GEPZ y Androhép. A continuación se revisan cada uno de ellos.

SCK-7. Fue uno de los primeros diluyentes de larga vida, desarrollados en 1975, en la Gran Bretaña por la compañía Livestock Development. Su composición química es desconocida para el público y se supone que deriva del IVT (Illinois Variable Temperature) modificado.

Se sabe que los ingredientes químicos son disueltos en agua destilada para elaborar cantidades de dos litros. La mitad de esta cantidad es saturada con CO₂ durante 10 minutos, depositada en botellas de plástico de 25 mL y posteriormente son selladas; la otra mitad se mantiene sin saturar para ser usada al momento de la inseminación. Los resultados de un período de seis años establecen una tasa de parición del 71.7%, la cual disminuye en un 10% del día 1 al día 6. El tamaño de camada fue de 10.2, con una reducción de 0.7 lechones cuando el semen fue usado hasta seis días después de la colección (Hooper 1981; Weitze 1990).

La adición de CO₂, al diluyente tiene como propósito inhibir el metabolismo y con ello prolongar la vida de los espermatozoides. Sin embargo, esto complica el manejo desde el punto de vista práctico, lo cual explica la escasa utilización de este diluyente.

Zorlesco. Este diluyente fue desarrollado en Italia por Gottardi et al (1980), quienes consideraron que es capaz de mantener la fertilidad de semen fresco por 10 días. En la elaboración de este medio se utilizó por primera vez la BSA (Gottardi et al 1980; Weitze 1990).

Al comparar este diluyente con el tipo Kiev, se encontró que a los 10 días el Zorlesco mantiene una motilidad del 50.1%, valor que debe ser tomado como el promedio mínimo aceptado, aunque espermatozoides con motilidades del 40% pudieran ser utilizados, pero implicaría considerables riesgos bajo condiciones prácticas. Por su parte, el Kiev al día 10, no presentó motilidad, alcanzando solo el 46% al segundo día. Otra diferencia entre ambos diluyentes, es la que se refiere al daño acrosomal; con el Zorlesco hay un daño del 5 al 10% en comparación con el 35% en el Kiev (Pig International 1982). Esto puede estar relacionado con la alta concentración de glucosa utilizada en el Kiev (60 g/L), en comparación con 11.5 g/L del Zorlesco (Gottardi et al 1980). Sin embargo, en un trabajo realizado por Pérez Lys et al (1986) donde compararon este último diluyente con el MR-A, se observó una motilidad del 10%, al día 9 de conservación para el Zorlesco. Por otro lado, Cheng (1988) encontró mayores porcentajes de motilidad espermática al compararlo con el Kiev, solamente después del tercer día.

De acuerdo con Gottardi et al (1980), el Zorlesco ha mostrado efectividad para prolongar la motilidad espermática; contrariamente, la fertilidad y prolificidad no se han logrado sostener incluso durante los primeros días de conservación; así por ejemplo, la tasa de partos obtenida con 1 a 4 días de conservación fue del 58.6%, mientras que la prolificidad fue de

8.5 lechones. Cuando el período de conservación se llevó de 5 a 8 días, la fertilidad cayó al 43% y la prolificidad fue de 7.0 lechones. Contrariamente, cuando la inseminación se realizó con semen de 2 a 3 días de edad, la tasa de partos y prolificidad alcanzadas fueron del 73.2% y de 8.9 respectivamente. Es evidente que no existe correlación entre los parámetros in vitro con los resultados in vivo, además sobresale un descenso en la fertilidad al avanzar el período de conservación. Por otra parte, al comparar los resultados de fertilidad en los períodos de 1 a 4 contra 2 a 3 días de conservación, se manifiesta que no existe regularidad en los resultados con este diluyente, todo lo cual hace suponer que posiblemente posee un desbalance en la formulación de solutos, así como también que la baja presión osmótica está afectando negativamente.

Modena y Bütschwiler. El diluyente Modena surgió al modificarse el Zorlesco, incrementándose la proporción de glucosa y eliminando la BSA. Este diluyente se probó en varios países, con resultados diferentes a los observados en Italia. El Bütschwiler deriva del Modena adicionando cisteína e incrementando la glucosa (Weitze 1990). Diferentes autores han confirmado que el Bütschwiler posee propiedades como diluyente de larga duración, aunque se observa una ligera reducción en las tasas de concepción y parición, 90.7 contra 81.1 al día primero a segundo, y del tercero al cuarto día de conservación, respectivamente (Laforest y Allard 1995).

Resultados de motilidad y fertilización in vitro han mostrado que con la adición de antibióticos como la gentamicina y polimixina B, el semen diluido en ambos diluyentes, puede ser almacenado por 7-8 días a 10 ó 15°C, sin afectar su capacidad de fertilización (Sone et al 1992).

En un trabajo más reciente se compararon parámetros in vivo de semen conservado durante 6 a 7 días en Bütschwiler a 18 y 5°C, este último con la adición de lactosa y yema de huevo. Se encontraron tasas de parición y tamaños de camada aceptables (85.0% y 10.4, respectivamente) para el semen conservado a 5°C y sin diferencia estadística con respecto al almacenado a 18°C (Park et al 1995).

MR-A. Este diluyente fue desarrollado en España, por Martín Rillo (1983). Su composición se desconoce; sin embargo, de acuerdo con Weitze (1990), puede contener BSA, glucosa, bicarbonato de sodio, citrato trisódico, EDTA y cisteína.

De conformidad con Pérez Lys et al (1984) en un estudio comparativo del MR-A contra el Zorlesco, se estableció que la motilidad observada sin cafeína fue superior para el MR-A, con 35 y 15%, contra 23 y 10% para el Zorlesco en los días 7 y 9, respectivamente.

Los resultados de trabajo de campo en España mostraron que la tasa de parición se mantuvo en un 76.1% al séptimo y octavo día, con una prolificidad de 8.5 lechones. Ello difiere de lo encontrado por Perestrelo (1988), quien señaló que la tasa de parición se mantuvo en un 73.7%, pero solamente hasta el quinto día, después de la colección. Por su parte García (1994) mostró resultados donde la fertilidad y prolificidad fue mantenida del día 1 hasta el 6 y 7. Respecto a prolificidad coincide con los obtenidos por Lyczynski y Kolat (1995), con un promedio de 10.1 lechones; sin embargo estos últimos autores encuentran una disminución en la fertilidad después del quinto día (66.3%). La misma tendencia fue encontrada por Laforest y Allard (1995), pero cuyo trabajo sólo fue llevado a 3-4 días. Adicionalmente estos investigadores, al comparar el MR-A contra Modena y Androhép,

no observaron diferencias entre MR-A y Androhep, mientras que sólo el Modena fue inferior a ambos diluyentes.

De acuerdo con lo anterior, es posible concluir que con este diluyente, la fertilidad se mantiene del día uno al cuarto y quinto, existiendo una disminución tanto en fertilidad como en prolificidad después de ese momento.

Zorpva. Este diluyente fue desarrollado por Cheng (1988), con la finalidad de sustituir la BSA usada en el Zorlesco, por el alcohol polivinílico (PVA), debido al alto precio del primer ingrediente, lo cual pudiera llegar a ser prohibitivo para su uso comercial. El mecanismo de acción del PVA se desconoce; sin embargo, se cree que ejerce una acción protectora sobre el espermatozoide, existiendo indicios de que influye en la tensión superficial.

Los trabajos iniciales con el diluyente Zorpva mostraron una superioridad tanto en motilidad como en morfología acrosomal intacta al ser comparado con Kiev, Zorlesco y Zornobsa, este último contiene la misma composición química que el Zorpva excepto PVA. La motilidad de los espermatozoides al día nueve fue del 53, 16.9, 31.4 y 22.8% para el Zorpva, Kiev, Zorlesco y Zornobsa, respectivamente, y la proporción de acrosomas normales fue del 82.1, 67.7, 73.9 y 75.9%, respectivamente. En cuanto a la tasa de fertilización, se mantuvo en un 94% al día 8 y 9 postcolección contra un 55% observado para el Kiev (Cheng 1988).

Estos resultados no coinciden con los encontrados por Revell y Glossop (1989), quienes observaron que al día 5, existe solamente un 20% de motilidad espermática en Zorpva, en tanto que el número de acrosomas normales al día 6 fue de 32%. Estos resultados indican que el Zorpva no es capaz de conservar elevadas tasas de motilidad y de morfología acrosomal normal, al quinto día de conservación. Los escasos resultados con el Zorpva y el Zornobsa no son consistentes, por lo que se requieren trabajos adicionales.

Reading. Revell y Glossop (1989), modificaron el Zorpva, sustituyendo la penicilina y estreptomina, por lincomicina y espectinomicina, y para mejorar la preservación de los acrosomas, le agregaron trehalosa y cloruro de potasio. A esta variación del Zorpva se le conoce como Reading. Los antibióticos se seleccionaron sobre la base de su estabilidad en el pH del diluyente y la compatibilidad con el resto de los componentes. Los resultados obtenidos muestran que el Reading presentó mayores porcentajes de motilidad al día 4 y 6 (70 y 50%) con respecto al Zorpva (50 y 5%). De la misma forma la tasa de concepción del semen diluido en Reading y Zorpva fue mayor para el primero en el día 4 a 5 (83.3 contra 58.3%) y en el día 5 a 6 (75 contra 12.5%). Parece ser que el mayor efecto sobre la integridad acrosomal obtenida en el Reading (75%) del día 6 al 7, a diferencia de la escasa preservación acrosomal obtenida con los diluyentes Zorlesco y Zorpva (32 y 60%), pudiera ser debido a la adición de la trehalosa y el cloruro de potasio (Revell y Glossop 1989). Es necesario confirmar estos resultados, ya que existen pocos informes, sobre este diluyente.

GEPZ. El nombre de este diluyente se formó con las siglas de la Granja Experimental Porcina Zapotitlán, dependiente de la FMVZ-UNAM. Martínez et al (1992b) y Pérez (1989), evaluaron este diluyente desarrollado por Becerril (2008, comunicación personal).

Los resultados del análisis in vitro, indican un elevado porcentaje de motilidad al día 6, con respecto al BTS que se utilizó como

testigo (50 contra 20%, respectivamente) y una mayor proporción de espermatozoides con acrosomas normales. Sin embargo, aunque la tasa de partos se mantuvo al día siete, ésta fue menor que la del BTS al día tres (76.2 contra 93.3%). En lo que se refiere a la prolificidad, el GEPZ produjo camadas significativamente más numerosas, 11.23 contra 10.75 para el testigo (BTS). Es preciso una mayor investigación con respecto a este diluyente.

Androhep. Este diluyente contiene BSA y un amortiguador orgánico, el HEPES, el cual es relativamente inocuo (Salisbury et al 1978).

Estudios realizados por Waberski et al (1994c) compararon la capacidad de fertilización en los días 2 contra 4, y 3 contra 5; así como la influencia de gotas citoplasmáticas con semen diluido en Androhep y Kiev, en dos experimentos. En el experimento 1 de este trabajo, encontraron que tanto la tasa de preñez como el tamaño de camada permanecieron constantes en el Androhep, en los días 2 y 4 (78.5 y 77.8%; 10.2 y 10.1, respectivamente). Por su parte el Kiev tuvo una caída en la tasa de gestación con respecto al Androhep al día 4 (68.5%). La prolificidad, aunque menor para el Kiev no fue diferente estadísticamente (9.5). Adicionalmente hubo un efecto de semental, donde las menores tasas de gestación (63.7 y 61.2%), se presentaron en los verracos con más altos porcentajes de gotas citoplasmáticas 31.9 y 39.9% respectivamente, al día 4 postcolección. En el segundo experimento no hubo diferencias entre diluyentes en la tasa de preñez en ambos días (3 y 5), mientras que el tamaño de camada se redujo significativamente en los dos diluyentes: 10.7 y 10.9 vs 10.0 y 10.4 en los días 3 y 5 para el Kiev y Androhep, respectivamente.

Por su parte Laforest y Allard (1995), coinciden en que la tasa de parición se mantiene del día 1 a 2 contra el 3 a 4, con 90 y 88.6%, respectivamente. Sin embargo para el caso de la prolificidad, ésta se mantuvo constante en los mismos días, éstos es 11.6 y 11.6, respectivamente.

De acuerdo con los resultados previos, la capacidad de fertilización para el Androhep puede ser mantenida por un período de cuatro días. Estos trabajos también sugieren que el uso de verracos con control de calidad del semen, puede prevenir la disminución de la fertilidad en semen preservado en diluyentes de larga duración.

En general, para la mayoría de los diluyentes de larga duración las tasas de fertilidad son mayores al 70% al quinto día de conservación. Sin embargo, existe un descenso en esta variable, por debajo de los óptimos (>85%), incluso durante los primeros días de almacenamiento. En lo que se refiere a motilidad espermática, aunque el conjunto de los resultados coinciden en que ésta se mantiene en rangos superiores al 50% al sexto día postcolección; parece ser que la motilidad no es el mejor indicador para predecir la capacidad de fertilización del semen, ya que es el que más variación presenta en los distintos trabajos, y en diversas ocasiones los resultados in vitro no coinciden con los obtenidos en las pruebas de campo. En este sentido, el proceso fisiológico de envejecimiento del esperma incluso durante los primeros días de conservación, no se ha logrado superar, lo cual se manifiesta como una reducción en la capacidad de fertilización.

Por lo anterior, se puede afirmar que ninguno de los diluyentes de larga duración existentes, aún no ha logrado cumplir con todos los atributos que debe tener un diluyente, según Reed (1990):

mantenimiento de viabilidad por períodos prolongados con un máximo de fertilidad y mínimo costo; siendo necesario mejorar las estrategias de conservación del semen.

No obstante lo anterior, algunos de los diluyentes de larga duración, tal como el MR-A y el Androhep, están siendo comercializados en México, sin que existan trabajos previos en este país, que permitan fundamentar su desempeño. Adicionalmente, en estos diluyentes la información es escasa, siendo necesario confirmar sus resultados.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la presente revisión, los diluyentes Reading, Androhep y MR-A son los que parecen tener un mejor comportamiento, tanto in vitro como en pruebas de campo y se convierten en los candidatos de elección para ser estudiados, bajo las condiciones de México. Además, un diluyente que goza de amplia aceptación mexicana, particularmente en los centros de inseminación artificial en la región de "El Bajío", es el Bütschwilser o Modena Modificado, al cual por su comportamiento se le puede clasificar también como un diluyente de larga duración. Sin embargo, no existe información suficiente que confirme tales características.

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 Fertilization*, 2:42-53

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

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

Anónimo. 1982. A longer life for semen. *Pig International*. August, p 20-24

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

Aumaitre, L.A., Dourmad, J.Y. y Henry, Y. 1997. Nutrition, manure and odour control in swine production in Europe. In: 28th Annual Meeting. American Association of Swine Practitioners, p 531-537

Bavister, B.D. y Andrews, J.C. 1988. A rapid sperm motility bioassay procedure for quality-control testing of water and culture media. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 5:67-75

Bedford, J.M. y Hoskins, D.D. 1990. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: *Marshall's Physiology of Reproduction* (G.E. Lamming, editor). 4th edition. Churchill Livingstone. Londres, 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 their 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 Fertilization*, 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, F.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. *Porcrama*, 21:57-76

Colenbrander, B. y Kemp, B. 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *Journal of Reproduction and Fertilization*, 40(supplement):105-155

Colenbrander, B., Feitsma, H. y Grooten, H.J. 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertilization*, 48:207-215

Crabo, B.G. y Dial, D.D. 1992. Artificial insemination in swine. *Veterinarian Clinics of North America: Food Animal Practitioner*, 8:533-544

Cheng, W.T.K. 1988. Preservation of boar semen at 15°C. *Journal of Chinese Society of Veterinary Science*, 14:339-350

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

Dixon, K.E., Songy, E.A., Thrasher, D.M. y Kreider, J.L. 1980. Effect of bovine serum albumin on the isolation of boar spermatozoa and the fertility. *Theriogenology*, 13:437-444

Du Junying, Jun Tao, Kleinhans, F.W., Peter, A.T. y Critser, J.K. 1994. Determination of boar spermatozoa water volume and osmotic response. *Theriogenology*, 42:1183-1191

Estienne, M.J., Knigh, J.W. y Beal, W.E. 1989. Long-term liquid storage of porcine spermatozoa separated using a discontinuous bovine serum albumin gradient. *Journal of Animal Science*, 67:1497-1502

Flowers, W.L. y Esbenshade, K.L. 1993. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*, 48:217-228

Flowers, W.L. 1996a. Common issues associated with on-farm A.I. use. In: Allen D. Leman Swine Conference, 23:69-73

Flowers, W.L. 1996b. Semen evaluation, extension, packaging and transportation methods. In: 27th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners. Nashville, p 469-479

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

Flowers, W.L. 1996d. Successful AI programs. In: Swine Reproduction Symposium. Hastings, p 15-25

Flowers, W.L. 1998. Main causes of reproductive failure due to artificial insemination: diagnosis and solutions. In: V Simposio Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial en

Porcinos. León (Guanajuato), p 17-25

Foley, C.W., Heidenreich, C.J., Harrington, R.B., Jones, J.H. 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

Galber, R., Hedge, R. y Hughes, D. 1983. Degradation of high purity water on storage. *Journal of Liquid Chromatography*, 6:2565-2570

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 Fertilization*, 98:439-449

Geografía del Estado de Michoacán. 1974. Geografía Física. Editora y Distribuidora, Sociedad Anónima, 1:245-309

González-Chabbari, E. y Rillo, S.M. 1994. Técnicas de fluorescencia para la valoración espermática. *Porcira*, 21:45-54

Gottardi, L., Brunel, L. y Zanelli, L.. 1980. New diluent media for artificial insemination in pig. In: 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid, 3:275

Guilmoto, H. y Rigault, M. 1996. Use of ceftiofur in boar semen diluent. In: 14th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Bologna, p 66

Honeyman, M.S. 1996. Sustainability issues of U.S. swine production. *Journal of Animal Science*, 74:1410-1417

Hooper, P. 1981. Spanish success with fam AI. *Pig International*. September:17-22

Hooper, P.N., Walters, J.R. y Green, C.G. 1986. Successful Pig. A.I. Programmes in Tropical and Subtropical Countries. *World Review of Animal Production*, 22(2):67

Juang, H.H., Musah, A.I. y Anderson, L.L.. 1990. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and caffeine are antagonistic to atrelaxin serum inhibition of porcine sperm motility. *Animal Reproduction Science*, 22:253-260

Kanis, E. 1993. Sustainable pig production? A scenario for pig breeders. *Pig News and Information*, 14:101-104

Komiewicz, B., Szczesniak-Fabianczyk, B. y Smorag, Z. 1995. The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 273-274

Laforest, J.P. y Allard, D. 1995. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 275-276

Levis, D.G. 1995. Procedures for collecting, evaluating and diluting boar semen. In: The 36th George A. Young Swine Conference, p 70-84

Lyczynski, A. y Kolat, K. 1995. Boar semen preservation in MR-A diluent. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 271-272

Martínez, E., Ruiz, S., Roca, J., Vázquez, J.M. y Coy, P. 1992a. Nuevas técnicas en contrastación seminal porcina. *Medicina Veterinaria*, 9:71-83

Martínez, M.C., Becerril, A.J., Conejo, N.J., Navarro, F.R. y Soto, F.M.A.. 1992b. Motilidad y morfología acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en los diluyentes GEPZ y BTS. In: XXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de 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*, 6:95-103

Paquignon, M. y Courot, M. 1981. Advances in boar semen preservation technology in France. *Pig News and Information*, 2:397-400

Park, C.S., Cheon, Y.M. y Xu, Z. 1995. Comparison of preservation of liquid boar semen between lactose-egg yolk and Bütschli diluents. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 269

Pedersen, P.N. y Borge, L.V. 1995. Use of different temperatures in boar semen diluents. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 277-278

Perestrelo, V.H. 1988. Swine artificial insemination with fresh semen. Practical results and interest of the method. *Revista Portuguesa de Ciencia Veterinaria*, 83:295-301

Pérez Lys, G., Lozano, C.J.J., y Sánchez, S.R. 1984. Fertility results in swine using the sperma's diluents MR-A and Zorlesco in the long storage period at 15°C. In: 8th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Ghent, p 294

Pérez Lys, G., Lozano, C.J.J., y Sánchez, S.R. 1986. Resultados de fertilidad en el ganado porcino con el diluyente de esperma MR-A y Zorlesco, en período largo de conservación a 15°C. *Anaporc*, 8:16-17

Pérez, E.S. 1989. Fertilidad en cerdas inseminadas con semen diluido en GEPZ o en BTS. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, pp 17

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. 1972a. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, 34:278-283

Pursel, V.G., Johnson, L.A. y Schulman, L.L. 1972b. Loss of boar sperm fertilizing capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. In: VII International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Munchen, p 1597-1600

Pursel, V.G., Johnson, L.A. y Schulman, L.L. 1974. Acrosome

morphology of boar spermatozoa during in vitro ageing. *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

Ratto J. 1990. Reports about number of swine inseminations and farrowing results in Finland 1989, comparison between two diluents, EDTA and MR-A. In: Second International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, p 45

Reed, H.C.B. 1990. Commercial requirements for an effective fresh semen diluent. In: 2nd International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, p 255-270

Renard, P., Dumont, E., Griveau, J.F., Callegari, J.P. y Le Lannou, D. 1995. An overall lipoperoxidation is not involved in the loss of boar sperm motility during storage under anaerobic conditions. In: Third International Conference on Boar Semen Preservation. Mariensee, p 251-252

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. 1982. Reproducción e inseminación artificial porcina. Editorial AEDOS. Barcelona, p 51-113

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

Rodríguez, M.H. y Eriksson, B. 1994. Physiology and Preservation of Boar Semen. *Reproduction of Domestic Animals*, 29:376-378

Rodríguez, G.J.E., Caiza de La Cueva, F. y Rigau, T. 1995. Niveles de resistencia de los espermatozoides de verraco a condiciones de stress osmótico. In: VI Jornadas sobre Producción Animal. LIEA, 1:410-412

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

Salisbury, G.W., Vandemark, N.L. y Lodge, J.R. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Editorial Acribia. Zaragoza, p 463-468

Schilling, E. y Vengust, M. 1986. Osmotic pressure of boar semen. *Pig News and Information*, 7:1555

Schilling, E. 1991. The acrosome of boar spermatozoa and its relationship with semen quality and fertility. *Pig News and Information*, 12:515

See, M.T. 1996. Efficiency of genetic transfer using AI technology. In: 27th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, p 461-468

Sone, M., Chikyu, M., Yoshida, M., Bamba, K. y Ogasa, A. 1992. Storage of boar semen in liquid form. *Japanese Journal of Swine Science*, 29:41

Spronk, G.D. 1996. Increasing productivity and efficiency by using IA. In: 27th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, p 447-448

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

Stevermer, E.J., First, N.L. y Hoekstra, W.G.. 1964. Effect of osmotic pressure on boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 23:67-70

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., Lübbert, W., Bortolozzo, F.P., Willmen, T. y Petzoldt, R. 1994a. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology*, 41:1367-1377

Waberski, D., Meding, S., Dirksen, G., Weitze, K.F., Leiding, C. y Hahn, R. 1994b. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep y Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Animal Reproduction Science*, 36:145-151

Watson, P.F. 1990. Reproduction in the Male. In: *Artificial Insemination and the Preservation of Semen* (G.E. Lamming, editor), 2:778-784

Weitze, K.F. 1990. The use of "long-term extender" in pig IA - a view of the international situation. *Pig News and Information*, 11:23-26

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

Weitze K.F. y D. Waberski. 1994. Artificial Insemination in Pig Farms. *Reproduction of Domestic Animals*, 29:374-375

ANEXO 1. Composición química de diluyentes de larga duración para semen de verraco (g/L). Composición química de diluyentes de larga duración para semen de verraco (g/litro). Composición química de diluyentes de larga duración para semen de verraco (g/L). Composición química de diluyentes de larga duración para semen de verraco (g/litro).

Componentes	Tipo de diluyente de semen porcino						
	Zorlesco	Zornobsa	Zorpva	Bütschwiler (MM)	Reading	Androhep	MR-A
D-glucosa	11.5	11.5	11.5	35.0	11.5	26.0	+
Bicarbonato de sodio	1.75	1.75	1.75	1.0	1.75	1.2	+
EDTA	2.35	2.35	2.35	2.25	2.35	2.4	+
Citrato sódico	11.65	11.65	11.65	6.9	11.65	8.0	+
Tris	5.5	5.5	5.5	5.65	5.5	-	-
Ácido cítrico	4.1	4.1	4.1	3.15	4.1	-	-
BSA, fracción V	5.0	-	-	3.0	-	2.5	-
HEPES	-	-	-	-	-	9.0	-
Cisteína	0.07	0.07	0.07	0.054	0.07	-	+
Trehalosa	-	-	-	-	1.0	-	-
Alcohol polivinílico, tipo II	-	-	1.0	-	1.0	-	-
Cloruro de potasio	-	-	-	-	0.75	-	-
Sulfato de estreptomicina	1.0	1.0	1.0	-	-	-	-
Lincomicina-espectinomicina (1:2)	-	-	-	-	1.0	-	-
Penicilina benzatínica sódica, UI	1.000.00	1.000.00	1.000.00	-	-	-	-
Análisis							
pH	6.7	6.6	6.6	-	6.4	6.8	6.69
Presión osmótica, mOsm/L	240	287	281	284	284	309	290

Elaborado a partir de Cheng (1988), Revell y Glossop (1989), Weitze (1990) y Waberski et al (1994b)