

01669
ley.
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de la Adición de Progesterona al Semen de Verraco antes y después de la Congelación sobre la Fertilidad, Morfología y Motilidad de los Espermatozoides.

T E S I S

Que para obtener el Grado de:
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL

P r e s e n t a :

José Castañeda Moreno

Asesores:

MVZ. MC. JOAQUIN BECERRIL A.
Asesor Principal

MVZ. DMV. JAVIER VALENCIA

ING. PHD. LUIS LANDOIS P.

Febrero 1966





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	4
1. Aspectos generales de la inseminación arti- ficial en el ganado porcino	4
1.1. Antecedentes Historicos	4
1.2. Estado actual de la inseminación artificial en el ganado porcino	5
1.3. Colección de Semen	7
1.3.1. Vagina Artificial	7
1.3.2. Técnica de la mano enguantada	8
1.3.3. Electroeyaculación	8
1.4. Características del Eyaculado	9
1.5. Frecuencia de la colección de Semen	10
1.6. Evaluación del Semen	11
1.6.1. Motilidad Progresiva	12
1.6.2. Morfología del espermatozoide e integridad acrosomal.....	14
1.6.3. Contenido de proacrosina	18
1.6.4. Medición de otras enzimas.....	19
1.6.5. Prueba de resistencia osmótica	20
1.6.6. Otras pruebas para semen	20
1.7. Número de espermatozoides por dosis.....	21

1.8.	Algunos aspectos de la actividad reproductiva de la cerda	22
1.8.1.	Detección de estro	23
1.8.2.	Momento de la ovulación	24
1.8.3.	Control del estro y la ovulación	25
1.8.4.	Momento de la inseminación	25
1.8.5.	Técnica de la inseminación	28
2.	Preservación de los espermatozoides de cerdo por medio de la congelación	29
2.1.	Antecedentes	29
2.2.	Composición de los diluentes usados en la congelación de semen de verraco	31
2.3.	Procedimientos para congelar semen de verraco	37
2.4.	Métodos y medios para descongelar el semen de verraco que ha sido congelado ...	40
3.	Uso de sustancias adicionadas al semen .	44
3.1.	Oxitocina y carbacolina.....	44
3.2.	Progesterona	45
3.3.	Protanglandinas	46
3.4.	Formaldehido	47
III.	MATERIAL Y METODOS	48
1.	Animales experimentales	48
2.	Grupos experimentales	49
3.	Procedimiento experimental	50
3.1.	Colección del semen	50

Página

3.2.	Evaluación del semen fresco.	52
3.3.	Procedimiento de congelación	52
3.4.	Procedimiento para descongelar	53
3.5.	Evaluación del semen descongelado	54
3.6.	Momento y técnica de la inseminación ..	55
3.7.	Evaluación de la fertilidad	56
3.8.	Análisis estadístico	
IV.	RESULTADOS	58
V.	DISCUSION	64
VI.	CONCLUSIONES	70
VII.	LITERATURA CITADA	71
VIII.	RECONOCIMIENTOS	

RESUMEN

CASTAÑEDA MORENO JOSE. Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes y después de la congelación sobre la fertilidad, morfología y motilidad de los espermatozoides. (Bajo la dirección de: Joaquín Becerril Angeles, Javier Valencia Mendez y Luis Landois Palencia.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes después de la congelación sobre la morfología, motilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides.

El semen de cada eyaculado, de un verraco de raza Landrace, fue dividido en tres porciones para ser tratado en tres maneras, el tratamiento A consistió en agregar 5 mg de progesterona al semen antes de la congelación, al grupo B se le agregó 5 mg de progesterona después de la descongelación y al grupo C no se le añadió progesterona durante el proceso de congelación o descongelación.

El semen fue evaluado antes y después de la descongelación, se inseminaron tres grupos de cerdas primerizas con una doble inseminación, la primera a las 24 horas de detectado el estro y la segunda unas 10 horas después. Las tasas de fertilidad fueron del 53.84, 46.15 y 61.53 por ciento para los grupos A, B y C respectivamente. Aunque se nota una

tendencia a favor del grupo no tratado no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre los grupos.

El número de embriones a los 35 días de edad en promedio, fué de 5.71, 6.63, 8.25 para los grupos A, B y C. El mayor número de embriones se encontró en el grupo no tratado sin embargo no hubo diferencia estadística ($P > 0.05$) significativa entre los grupos.

Los porcentajes de espermatozoides que conservan su acrosoma normal (NAR) después del proceso de congelación y descongelación fueron de 50.53, 49.69 y 46.85% para los grupos A, B y C. Aquí se notó que el mayor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma normal fué para los grupos tratados con progesterona, pero no se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$).

Se encontró una correlación ($r = 0.15$) muy baja entre la motilidad medida inmediatamente después del descongelamiento y la motilidad después de un período de incubación a 37°C durante 30 minutos. La motilidad medida después de este tiempo fué de 45.38, 40.57 y 40.19 para los grupos A, B y C, el mayor porcentaje de recuperación de la motilidad fué para el grupo tratado con la progesterona antes del congelamiento, no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) después del análisis de varianza.

Bajo las condiciones de este trabajo se demostró que - la progesterona añadida al semen no tiene influencia positiva o negativa sobre la tasa de fertilización, el número de embriones, la morfología del acrosoma o la motilidad de los espermatozoides de verraco que han sido congelados y descongelados.

INTRODUCCION

La rentabilidad de una explotación porcina se basa en la utilización eficiente de los recursos humanos e instalaciones, así como en la implementación de programas de medicina preventiva, de alimentación, reproductivos, genéticos y de comercialización. El éxito o fracaso de la explotación depende entre otras cosas de la capacidad y eficiencia reproductiva del pie de cría (22).

Dentro de los programas reproductivos y genéticos, la inseminación artificial (IA) con semen diluido de verraco ocupa un lugar prominente, ya que ha permitido la creación de una porcicultura más productiva, por ello, ha sido adoptada como una práctica cotidiana por un gran número de porcuicultores en muchos países (25, 27, 36, 37, 52, 55).

Desde 1971 (80), se han desarrollado un gran número de técnicas para la conservación de semen de verraco por medio de la congelación, lo que ha permitido su utilización de una manera más amplia (38, 39, 40, 65).

Aunque la tasa de fertilidad del semen congelado de verraco sea inferior a la del semen diluido, ofrece las ventajas de que se puede conservar durante mucho tiempo, lo que facilita su manejo y transporte, permitiendo la conservación

y difusión de material genético muy valioso (80), de la misma manera se evita la difusión de enfermedades (17).

La búsqueda de sustancias que ayuden a mejorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de cerdo, usados en la IA, después de diluidos o congelados ha conducido a numerosos estudios (4, 5, 15, 47, 63) los que han tenido resultados variables.

Niwa et al. (61) adicionando prostanglandina F2 alfa al semen diluido de verraco obtuvieron una tasa de concepción más alta para el semen tratado que para el grupo testigo.

Hunter (30) encontró que el número de espermatozoides en el sitio de fertilización se incrementaba al depositar 1 miligramo de progesterona debajo de la serosa de la unión uterotubárica.

Becerril (5) obtuvo una mejor tasa de concepción y camadas más numerosas en cerdas inseminadas artificialmente con semen diluido de verraco que había sido tratado con 5 mg de progesterona cristalina que aquellos inseminados con semen que no había sido tratado con progesterona.

El objeto del presente trabajo fué investigar el efec

to de la adición de progesterona al semen de verraco antes y después de la congelación, sobre la morfología, motilidad y capacidad fertilizante del semen, usando la técnica de congelación descrita por Pursel y Johnson (77).

II. REVISION DE LITERATURA

1.- Aspectos generales de la inseminación artificial (IA) en el ganado porcino

1.1. Antecedentes históricos

La historia de la (IA) se inicia en la Mitología, en leyendas que datan de tiempos en que aún no se comprendía la función del coito. Se relata por ejemplo, una historia del siglo XIV de un árabe que inseminó exitosamente a su yegua con semen colectado de un garañón propiedad de una tribu vecina hostil. Pero el crédito de la primera IA se le da a Lázaro Spallanzani un fisiólogo italiano, que inseminó con éxito a una perra utilizando semen fresco en 1780 (95).

Aunque los experimentos realizados por Spallanzani tuvieron buenos resultados, sólo pequeños esfuerzos se continuaron realizando en este campo y fué hasta el siglo XX en Rusia cuando se aplicó la inseminación artificial en forma extensiva a las yeguas. Desde 1930 se extendió su uso a otros animales de granja, iniciando de esta manera el desarrollo para su utilización en gran escala. Sin embargo, hasta después de la Segunda Guerra Mundial fué cuando se expandió rápidamente (42).

En el cerdo las primeras experiencias con IA las realizó Milanov en 1932 y desde entonces el proceso para mejorar los resultados y su aplicación práctica han sido lentos (86). No obstante se han abierto nuevas posibilidades de progreso en el campo de la inseminación porcina, desde el logro de la congelación exitosa de semen de verraco, seguida por la fertilización (68). De allí que las investigaciones en el campo de la reproducción porcina se encaminen a perfeccionar este aspecto.

1.2. Estado Actual de la Inseminación Artificial en el Porcino

Como se muestra en el cuadro 1, un considerable número de cerdas son inseminadas artificialmente en países donde un mejoramiento genético es sistemáticamente promovido (21).

Rápidos adelantos técnicos han sido logrados con la IA en el cerdo, algunos datos indican que en la República Democrática Alemana se ha incrementado el número de cerdas inseminadas de 160,000 en 1970 a 1'690,000 para 1981 con una tasa de partos del 72 al 78%. También se ha logrado, en muchos lugares, aumentar el número de lechones por camada de 9.1 a 9.9 (21, 37, 41).

CUADRO 1

NUMERO DE CERDAS INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE (1977-78)

PAIS	No. DE CERDAS CUBIERTAS	No. DE CERDAS INSEMINADAS
AUSTRALIA	-----	3,000
AUSTRIA	405,000	50,000
BELGICA	626,000	11,894
CHECOSLOVAQUIA	525,605	170,000
DINAMARCA	1'800,000	350,000
FINLANDIA	122,000	67,945
FRANCIA	120,000	80,000
ALEMANIA (RD)	1'195,900	1'016,515
ALEMANIA (RF)	2'309,873	241,034
GRECIA	600,000	-----
HUNGRIA	713,000	232,321
JAPON	1'850,000	48,000
COREA	399,00	78,530
PAISES BAJOS	1'587,925	317,585
NORUEGA	134,000	65,000
PERU	352,250	-----
FILIPINAS	62,500	62,500
ESPAÑA	1'212,000	35,000
SINGAPUR	9,370	7,357
TAILANDIA	2'989,751	6,711
U.R.S.S.	1'641,600	61,041
U.S.A.	15'000,000	90,000
YUGOSLAVIA	1'406,000	90,696

A. IRITANI (36)

El semen congelado de verraco es aún utilizado en una escala muy limitada, debido principalmente a que consume mucho tiempo y esfuerzo el proceso de congelación y descongelación, además, de las bajas tasas de fertilidad comparadas con la IA con semen fresco y diluido o con la monta natural, sin embargo, tiene un futuro promisorio (99).

1.3. Colección de Semen

Se han descrito diversos métodos para la colección del semen de verraco, los cuales involucran la estimulación directa de la musculatura del aparato genital del macho o simulan la influencia de la vagina sobre el pene, estos métodos son: la vagina artificial, la técnica de mano enguantada y la electroeyaculación (32, 86).

1.3.1. Vagina artificial

Varios autores han utilizado el método de vagina artificial para la colección de semen en el verraco (10, 29, 33, 42). Este método es el que más se parece a las condiciones naturales, con el se pretende simular la temperatura, presión, lubricación y posición de la vagina de la hembra, con el objeto de obtener del macho los mejores resultados (32, 95).

El uso de la vagina artificial esta muy extendido en el bovino y equino, sin embargo en el caso del cerdo es sola mente usada en la República Democrática Alemana (45).

1.3.2. Técnica de la mano enguantada

Es el método más generalizado para la colección del semen de verraco en la mayoría de los países (32, 38, 38, 53, 64, 65, 72, 77, 77, 81, 101) debido a que es relativamente fácil, barato y repetible (33).

Básicamente con esta técnica y utilizando la mano se simula la presión que sobre la porción espiral del pene producen los anillos cervicales lo que estimula el reflejo de eyaculación al verraco.

En estas dos técnicas para la colección de semen de verraco se utiliza una hembra en calor o lo que es más común un maniquí para que sea montado en el proceso de colección. Los verracos tienen muy poca dificultad para acostumbrarse al maniquí y su entrenamiento suele ser rápido (29)

1.3.3. Electroeyaculación

Para el uso de este método se requiere sedación o anestesia general (33). Una sonda bipolar se introduce dentro del recto, la cual produce pulsaciones de bajo voltaje

que estimulan la musculatura del aparato genital dando lugar a la eyaculación (32). La electroeyaculación se recomienda para cerdos que tienen libido reducida o bien con problemas de locomoción (86).

1.4. Características del Eyaculado

El eyaculado esta formado por una porción líquida y una sólida o gelatinosa, este gel no es importante y puede ser eliminado filtrando el eyaculado a través de una gasa que cubra el recipiente de colección (33, 53, 54).

Usualmente de 5 a 15 ml , de una fracción clara preespermática es emitida primero, seguida por cantidades variables de la porción gelatinosa (33, 42), la siguiente fracción es una porción líquida de color cremosa, que se conoce como fracción rica y varía en un volumen de 50 a 120 ml (42). Se ha observado* que durante la colección del semen la porción rica en espermatozoides es emitida en varias fracciones durante la eyaculación. Después de ésta, es emitida una fracción clara pobre en espermatozoides (42) ,

Generalmente durante el eyaculado se emiten de 150 a 500 ml de semen con un contenido de 250 a 350 millones de espermatozoides por ml (32).

* Comunicación Personal. Becerril, J.

Aunque es común el uso de la fracción rica en espermatozoides del eyaculado, en recientes investigaciones, se ha encontrado que el semen obtenido durante la eyaculación de la fracción rica, contenía espermatozoides con mayor incidencia de gota citoplásmica en la porción distal que el eyaculado completo, por lo que se sugiere que para la inseminación debería utilizarse el eyaculado total (34).

1.5. Frecuencia de la Colección de Semen

La pubertad del semental porcino se presenta, por término medio, cuando cuenta con cinco o seis meses de edad. A medida que la edad del cerdo aumenta, se eleva el número total de espermatozoides en el eyaculado a los siete y medio meses se alcanza el límite en calidad de los eyaculados de tal manera que desde los ocho meses de edad los verracos jóvenes pueden ser colectados una o dos veces por semana, aunque sin sobrepasar el máximo de seis eyaculaciones mensuales (45).

Los verracos de más de un año de edad se pueden incluir en el ritmo normal de obtención de semen, es decir de dos a tres eyaculados por semana y un máximo de ocho a nueve por mes (32, 45).

Las eyaculaciones repetidas de un grupo de verracos,

de más de un año de edad, a intervalos de cuatro, dos y un día produjeron cantidades totales de 54.9×10^9 , 39.5×10^9 y 23.7×10^9 espermatozoides por eyaculado respectivamente. Esto sugiere la posibilidad de colectar el semen de los verracos diariamente con resultados satisfactorios (95). Sin embargo, Rillo (86) dice que las colecciones deben ajustarse a intervalos de 3 a 8 días. Jones (42) recomienda obtener tres eyaculados por semana para cerdos adultos.

Al aumentar la frecuencia en la obtención de semen, de un eyaculado cada dos semanas a dos eyaculados por día disminuyeron los valores referentes a volumen, concentración, total por eyaculado, incidencia de gota citoplasmática distal y formas anormales en la región de la cola (34).

1.6. Evaluación del Semen

Un método exacto para estimar la capacidad fertilizante del semen sería una herramienta extremadamente útil para todos los interesados en la reproducción animal. Aunque el desarrollo de tal método haya sido durante mucho tiempo una meta, intentos pasados para seleccionar el macho más fértil dentro de un grupo han sido desilusionantes. Este problema se hace más aparente cuando consideramos que la fertilidad del espermatozoide es una función biológica muy compleja (16).

Aunque todavía no se dispone de ningún método o procedimiento que permita determinar por medición directa el poder fecundante del semen de verraco, se conocen, no obstante algunas de las características que debe exhibir el semen de buena calidad las que se determinan mediante pruebas in vitro (45).

El principal objetivo de los métodos in vitro para medir el potencial de la capacidad fertilizante, es determinar cuales o cuantas células son funcionalmente competentes para llevar a efecto el proceso de fertilización (16). Los criterios más comunmente usados en la calificación del semen son: El número total de espermatozoides en el eyaculado de 30 a 60 mil millones, el volumen que varía en el cerdo de 100 a 500 mililitros, la motilidad progresiva que sea mayor del 70%, las anomalías primarias menores del 10% y las anomalías secundarias menores del 15% (6, 45, 54, 86, 95).

1.6.1. Motilidad progresiva

La evaluación de la motilidad es uno de los criterios más usados para determinar la calidad del semen de verraco antes de ser sometido al proceso de congelación (39, 49, 50, 53, 64, 65), y después de descongelado. Cuando los espermatozoides de toro, verraco o carnero son repentinamente enfriados a temperaturas entre 15 y 0 C, hay una pérdida irre-

versible de la motilidad (74).

La evaluación de la motilidad debe hacerse inmediatamente después de colectado el semen, la muestra se debe colocar en una laminilla tibia, limpia y seca y observarse a bajo aumento (10 X) (32, 33). Los métodos para medir la motilidad van desde el método anterior, que es muy subjetivo, hasta métodos tan sofisticados como es el análisis de la motilidad por medio de la cinematografía, estos métodos aún usando computadoras para su análisis no demostraron ventajas sobre la menos costosa evaluación con el microscopio. De la misma manera se ha observado que la motilidad y la fertilidad aunque tienen una correlación positiva, es baja (16).

La prueba de **temorresistencia**, una estimación repetida de la motilidad realizada durante la incubación de los espermatozoides, después del descongelamiento, a 30 o 37 °C ha sido extensamente usada como criterio para calcular la sobrevivencia espermática (80, 64).

Larsson y Einarsson (50) encontraron que los espermatozoides con baja fertilidad mostraron mayor reducción de la motilidad durante la prueba de **temorresistencia** y consideran que esta prueba puede ser un indicador efectivo del daño que sufren los espermatozoides durante la congelación.

1.6.2. Morfología del espermatozoide e integridad acrosomal

En muchos de los trabajos clásicos sobre la morfología del espermatozoide se demostró que la infertilidad en el macho puede estar asociada a algunos cambios morfológicos en la población espermática (6). Esto coincide con trabajos más recientes en los que se afirma que cerdos con una producción de espermatozoides cuya forma se desvía de lo normal han sido totalmente estériles o por lo menos subfértiles (2).

Los defectos del espermatozoide se han dividido en dos grupos. 1) Anormalidades primarias: Son aquellas que se desarrollan durante la espermiogénesis y son causadas por procesos patológicos en el epitelio germinal. y 2) Las anomalías secundarias: Son las desviaciones que probablemente se originan después de que las células espermáticas abandonan el testículo (95).

Esta clasificación, aceptada durante mucho tiempo ha sido mejorada por Blom (6) que propone que las anomalías se dividan en defectos mayores y menores de acuerdo a su importancia para la fertilidad.

Alanko (2) encontró, estudiando cuatro cerdos cuyos espermatozoides tenían granulos protuberantes persistentes

en el acrosoma, que un alto porcentaje de los espermatozoides normales alcanzaban la zona pelúcida mientras los espermatozoides con algún defecto solo llegaban en un bajo porcentaje.

Es común encontrar eyaculados que tengan espermatozoides con algún defecto, de ahí que en el cerdo se considera que un eyaculado es normal si tiene menos de: 5% de cabezas deformes, 10% de gotas citoplasmáticas proximal, 5% de anomalías en el segmento de la pieza intermedia y 5% de colas dobladas (33).

El acrosoma es la porción del espermatozoide que se encuentra moldeada sobre el núcleo y cubierto por la membrana acrosomal rodeada a su vez por la membrana espermática (18). Un espermatozoide con el acrosoma intacto no puede penetrar un óvulo por lo que no puede liberar su contenido (3) esta reacción debe ocurrir en presencia del óvulo ya que de otra manera pierde su capacidad fertilizante (18) es por esto que la integridad del acrosoma es una buena medida de la capacidad fertilizante del esperma.

Durante los años recientes el examen morfológico de los acrosomas espermáticos con un microscopio de contraste de fase ha sido un valioso criterio para la evaluación de los espermatozoides (76).

Pursel et al. (74) categorizan en cinco grupos la morfología del espermatozoide de acuerdo a la integridad del -- acrosoma : 1) NAR si la capa acrosomal se adhiere suavemente al núcleo y posee un borde apical liso, 2) NAR' estos espermatozoides son iguales a los anteriores excepto por la adherencia de partículas pequeñas a la capa acrosomal, 3) DAR estos espermatozoides fueron identificados si el borde posterior de la cresta apical era más amplio y tenía forma irregular, 4) MAR son espermatozoides que han perdido la cresta apical, pero la capa anterior del acrosoma permanece estrechamente adherida a la cabeza del espermatozoide, 5) LAC son espermatozoides caracterizados por vesiculación del capuchón acrosomal anterior.

Larsson et al. (51), solo toman en cuenta tres categorías NA acrosomas normales, son aquellos que tienen un borde apical bien delineado sin signos de hinchazón, DA acrosoma dañado, en este grupo se incluyen un número variado de anomalías, pero sin pérdida de la substancia acrosomal, SDA acrosomas severamente dañados, en estos el borde acrosomal está desintegrado con aparente pérdida de substancia.

Potter et al. (71) solo consideran cuatro categorías de daño del acrosoma: acrosomas normales, acrosomas con ligero daño, acrosomas severamente dañados y pérdida del acrosoma. Durante el enfriamiento o el proceso de congelación,

los espermatozoides sufren la pérdida de la motilidad, pero, además existe pérdida irreversible de la actividad metabólica, licuado de las enzimas y proteínas intracelulares, incremento de la permeabilidad de la membrana celular a las tinciones y el acrosoma sufre pérdida marcada o desintegración que va acompañada de salida de enzimas que juegan un papel importante en la penetración (74).

La motilidad y la morfología acrosómica guardan una relación inseparable; Wilmut et al. (108) obtuvieron una buena recuperación de la motilidad, pero encontraron que a medida que la motilidad era mejor, el número de células espermáticas disminuía, esto mismo se encontró en estudios recientes en Alemania (91).

Pursel et al. (74) estudiando la motilidad a gran aumento vieron que los espermatozoides clasificados como DAR y MAR frecuentemente son móviles pero, los LAC no lo son y los NAR se encuentran móviles o inmóviles.

Rillo et al. (84) encontraron que, siguiendo un método que incluye la reducción de la presión osmótica, el efecto del plasma seminal, de la cafeína y el calor, más del 90% de las células con acrosomas normales o dañados son capaces de recuperar la motilidad, incluso los que al microscopio de contraste de fase se consideran perdidos, esto aporta una evi-

dencia más de que la motilidad no puede ser un criterio adecuado para la evaluación del semen congelado. Premll et al. (72) informan que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas normales, después del descongelamiento tuvo un promedio de 86.8 mientras que el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas intactos fué de 41.0; por ello, la evaluación de la integridad del acrosoma debe hacerse tomando en consideración solo los espermatozoides vivos.

1.6.3. Contenido de proacrosina

En el acrosoma existen varias enzimas las más importantes para la función del espermatozoide en la fertilización parecen ser la hialuronidasa y una enzima muy poderosa parecida a la tripsina, llamada acrosina (3). La retención de esta enzima como proacrosina ha sido usada para medir el potencial del espermatozoide en la fertilización, pero resulta poco útil por su complejidad (16).

Se debe considerar además de que los espermatozoides que llegan al útero no pueden encontrar azúcares libres, por lo que utilizan su cubierta de glicoproteínas, que libera azúcares después de un ataque enzimático, esta catalisis induce a una falla de inhibición acrosomal por lo que las enzimas pueden difundirse (75).

1.6.4. Medición de otras enzimas

Brown et al. (7) estudiaron la liberación de cinco enzimas la transaminasa glutámico oxalacética (GOT), la lactato deshidrogenasa (LDH), la colinesterasa y las fosfatasa ácido y alcalina, en el toro, verraco y pavo. La liberación de GOT dentro del medio extracelular fué hallada como el mejor indicador del daño celular. De ahí que se haya usado para estudiar los efectos de diferentes concentraciones de glicerol en las técnicas de congelación de semen de verraco (10,50,51).

Durante la glicerolización del semen que se va a congelar, se dan cambios bioquímicos en el espermatozoide, estos consisten en una pérdida de enzimas del acrosoma (hialuronidasa, acrosina) y de la pieza media (GOT) las cuales pueden ser medidas (98).

Graham y Pace (24) demostraron un incremento en la actividad de dos enzimas no acrosomales, GOT, y LDH en el medio extracelular, después del congelamiento y descongelamiento del semen de verraco.

Larsson y Einarsson (50) encontraron que había relación entre la fertilidad y liberación de aspartato aminotransferasa (ASAT) en el semen de verraco e indican la posi

bilidad de detectar a los verracos que producen semen de baja congelabilidad por medio de esta prueba de laboratorio. Por otro lado, Moore y Hibbit (57) demuestran que los altos niveles de enzimas liberados, después del descongelamiento, no son indicadores exactos de la capacidad fertilizante del semen de verraco que ha sido congelado y descongelado.

1.6.5. Prueba de resistencia osmótica

El valor de la prueba de resistencia osmótica (ORT) puede ser suficientemente exacto para predecir la calidad de un eyaculado en particular. Una buena calidad de las células espermáticas puede ser esperado de verracos con un valor ORT mayor de 65, y al contrario, una baja calidad puede esperarse con valores menores de 50. Un valor ORT mayor de 65 asegura porcentajes de motilidad y NAR de más del 60%; esta prueba se realiza sometiendo a los espermatozoides a medios hipotónicos o hipertónicos antes de la congelación para probar la integridad de la membrana acrosomal (92).

1.6.6. Otras pruebas para semen

La filtración del semen es otro de los métodos que podemos utilizar en la evaluación del semen de verraco (12,56). Esta prueba se hace colocando 0.1 ml de semen para ser filtrado en una columna de sephadex de 6 mm sobre lana con 3 ml exactos de una solución de citrato de sodio, después de la

adición de una gota de formaldehído a los espermatozoides filtrados, se colocan en una cámara de Spencer para ser contados (12). Memon et al. (56) encontraron que el número de espermatozoides que pasaban a través del filtro era mayor para los espermatozoides móviles, por lo que esta prueba puede ser un indicador de la calidad del semen. La prueba de fertilización in vitro mide la capacidad de los espermatozoides para penetrar oocitos previamente incubados (59).

1.7. Número de espermatozoides por dosis.

Durante el desarrollo de técnicas prácticas para la inseminación artificial en el cerdo, se hicieron numerosos ensayos para determinar la concentración y el volumen óptimos para alcanzar una buena fertilidad y obtener un número considerable de dosis sin afectar la fertilidad (69).

Baker et al. (4) encontraron que si usaban diferentes concentraciones de espermatozoides en un volumen de 20 ml de diluyente, ni siquiera la concentración más alta (10×10^9) de espermatozoides, usada era capaz de alcanzar los oviductos o fecundar los óvulos. En el mismo trabajo, cerdas primerizas inseminadas con 100 ml de semen diluido tuvieron una alta y significativa proporción de huevos fertilizados y más espermatozoides alcanzaron la zona pelúcida, que en aquellas inseminadas con 200 ml de semen. La inseminación con dos dó

sis de 5×10^9 o 10×10^9 espermatozoides resultó en un significativo número de espermatozoides en el oviducto y en mayor número de huevos fertilizados, que usando una dosis de 1×10^9 espermatozoides. Esto sugiere que para inseminar una cerda el volumen debe ser mayor de 20 ml y cercano a los 100 ml y el número de espermatozoides cercano a 5×10^9 .

En general hasta ahora el volumen y la concentración usadas en la inseminación artificial porcina ha variado de 2.5×10^9 (10,68), o 2×10^9 a 4×10^9 (9) hasta 5.5×10^9 (3), pero, cuando se habla de inseminación artificial con semen congelado y descongelado parece que la dosis más adecuada y la que se usa por casi todos los que trabajan con este tipo de semen es de 6×10^9 espermatozoides por dosis (12,23, 40,80,92,99,102). Maxwell y Salomon usarón dosis de 10×10^9 con buenos resultados (53).

1.8 Algunos aspectos de la actividad reproductiva de la cerda

Se han tratado algunos aspectos generales de la inseminación artificial en el porcino, todos ellos hacen referencia al macho, pero, la reproducción en los animales domésticos depende en una mayor proporción de la capacidad reproduc

tiva de la hembra. De ahí el interés en revisar brevemente algunas prácticas de manejo que se realizan con la hembra cerca o en el momento de que es inseminada, tales como la detección de estro, la determinación del momento de ovulación, el control del estro y el momento y técnica de la inseminación.

1.8.1. Detección del estro

El ciclo estral de la hembra porcina, dura unos 21 días en promedio de los cuales las 2 terceras partes están dominadas por la progesterona que causa que el animal no esté interesado o sea refractario al macho; cuando la progesterona cede su lugar a los estrógenos (proestro) hay un incremento de la actividad sexual, la vulva de la cerda se hincha, un poco después la hembra se deja montar por el macho, esta etapa receptiva es conocida como estro y dura aproximadamente unas 60 horas (32).

Es en este periodo cuando debe hacerse la inseminación de ahí que una de las prácticas más importantes en las explotaciones porcinas, desde el punto de vista de la reproducción, sea la detección de las hembras en estro (44). La práctica regular de detección del celo presupone un detallado conocimiento de las manifestaciones externas de las distintas fases del ciclo estral (45,86). Jones (42) afirma

que uno de los factores limitantes de la IA es un conocimiento incompleto de la fisiología reproductiva de la hembra.

La detección del estro debe hacerse en presencia de un verraco adulto con buena libido (4,31,53,77) que puede ser vasectomizado para evitar que geste a las marranas (42,48 49).

El mejor programa para la detección del estro consiste en llevarlo a efecto en las primeras horas de la mañana y a última hora de la tarde, procurando adaptarlo al manejo de la explotación (86).

1.8.2. Momento de la ovulación

La ovulación en la cerda ocurre durante el periodo de estro y es precedida por una onda específica de la hormona luteinizante (LH) que puede alcanzar una concentración en el suero de 4-5 ng/ml. La ovulación ocurre alrededor de 35 a 40 horas de iniciado el estro (31) o 40 a 42 horas de la onda de LH (32).

Hunter (31) Menciona que se pueden encontrar diferencias en el momento de la ovulación si la detección del celo se hace en ausencia de un verraco.

1.8.3. Control del estro y la ovulación

Los intentos de optimizar y facilitar la IA han conducido a numerosas investigaciones encaminadas a controlar el ciclo estral de las hembras y el momento de la ovulación (13).

En las cerdas prepúberes el inicio de la actividad o^varica se estimula por varios factores; el traslado o altera^ción del ambiente por la exposición a un verraco o usando tratamientos hormonales (106). Las investigaciones usa^do progesterona o sus progestagenos para el control del es^tro han sido numerosas (52,68,78,105,106) y han tenido éxi^to sobre todo en el control de la fase lutea, lo mismo que con el uso de estró^genos (25) no obstante, en el cerdo los me^jores resultados en el control e inducción del ciclo estral se han obtenido con el uso de gonadotropinas (20,22,26,31).

1.8.4 Momento de la inseminación

Se ha reportado que el momento para la inseminación con semen diluido es 12 horas antes de la ovulación. Resultados de experimentos con semen congelado indican que el momento óptimo para la inseminación es lo más cercano posible al momento de la ovulación, estos hallazgos están apoyados por observaciones en cerdas inseminadas durante el segundo

día de estro que tuvieron una tasa significativamente mas alta de gestaciones (70.3%) que aquellas inseminadas durante la tarde del inicio del estro. El corto tiempo de sobrevivencia del semen descongelado dentro del aparato genital de la cerda es probablemente la mayor razón para esta diferencia en la tasa de preñez (80).

Datos recientes muestran que los espermatozoides congelados y descongelados son removidos más rápidamente del aparato genital de la hembra que los espermatozoides de semen recientemente eyaculado (78). Esto quizá se debe a que en el caso del semen congelado hay una mayor cantidad de células que mueren en el proceso y entran en el aparato genital de las hembras, esto ha sido confirmado en estudios en los que se inseminó con espermatozoides vivos y muertos. En dichos estudios la recuperación de espermatozoides en los oviductos fué mayor para los vivos (101), de cualquier manera numerosos espermatozoides vivos y muertos fueron recuperados de la unión uterotubárica, la cual sirve como reservorio de espermatozoides en el cerdo. (19)

Polge et al. (58) usando semen congelado encontraron que el 83% de los óvulos fueron fecundados cuando la inseminación se llevó a cabo 6 horas antes de la ovulación y 4 días después de la misma. La tasa de fertilización fué 38% cuando

la inseminación se hizo 20 horas antes de la ovulación.

Muchos investigadores recomiendan que la inseminación se haga 24 horas después del inicio del estro, si se insemina una sola vez (39,64,65,69).

Larsson y Einarsson (49,50) inseminaron durante la tarde del primer día de celo y antes del medio día del siguiente día con intervalo de 16 a 20 horas.

Maxwel y Salomon (53) encontraron que la doble inseminación llevada a efecto 24 y 32 horas después de la detección del estro era más efectiva que una sola inseminación a las 24 horas de iniciado el estro. Esto coincide con otros autores que mencionan que la inseminación se debe llevar a cabo a las 12 y 24 horas del estro (37).

Iritani (36) menciona que la inseminación con semen congelado se hace 2 veces. Una en la mañana y otra en la tarde del segundo día del estro.

Existen en la actualidad otras formas de medir el momento adecuado para la inseminación, en una prueba de fertilidad con semen congelado, se inseminaron 164 cerdas primeras a tiempo predeterminado, 32 a 34 horas después del inicio del estro; otro tanto fué inseminado sobre la base de

los cambios de resistencia del moco vaginal, la inseminación se hizo cuando el omhmetro marcaba entre 54 y 64 en una escala de 0-100. Nose encontraron diferencias entre los tiempos de la inseminación y las tasas de gestación (38).

1.8.5. Técnica de la inseminación

Durante la aplicación del semen hay que tener en cuenta las características anatómicas y fisiológicas del aparato genital de la hembra (86). Desde hace tiempo se han venido realizando investigaciones para encontrar el mejor instrumento para depositar el semen en el útero de la marrana; en un estudio que involucró el pasaje de catéteres para inseminar, dentro del canal cervical de cerdas adultas y primerizas en diferentes etapas del ciclo estral, la penetración más profunda se logró cuando los animales no estaban en estro. Se encontró que un catéter de hule de diámetro interior de 12 mm con una serie de espirales posteriores a la punta, se cerraba firmemente dentro del cervix de las hembra adultas y primerizas en el estro o cerca de él pero no en aquellas que se encontraban en la mitad del ciclo (55).

La fijación correcta del catéter proporcionará estímulo que aumenten las contracciones uterinas, lo que determinará un incremento en la velocidad del paso de los espermatozoides por el aparato genital (86).

La pérdida de semen en la cerda durante la técnica de inseminación es debida a las contracciones uterinas y a una insuficiente aposición del catéter a los bordes cervicales pero, algún semen debe perderse en forma normal, pues la fracción gelatinosa que normalmente bloquea el cervix, ha sido removida (32).

Actualmente se utilizan tres tipos de catéter: Melrose, Allard y Alemán; los dos últimos se emplean fundamentalmente en los países nórdicos y Alemania respectivamente. El modelo Melrose que tiene el tamaño y la forma del pene del verraco se utiliza en Inglaterra, Francia y Estados Unidos y también es el más usado en México (86).

2.0 Preservación de espermatozoides de cerdo por medio de la congelación

2.1. Antecedentes

Aunque los científicos lograron la congelación exitosa de semen de bovino desde hace más de treinta años, estas mismas técnicas aplicadas a la congelación de semen de verraco, produjeron pérdida irreversible de la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Modificaciones hechas al procedimiento diseñado para el semen de toro, tuvieron como resultado numerosos reportes de logros en la preserva-

ción de la motilidad de los espermatozoides y ocasionales reportes de fertilidad (80).

Los primeros resultados de fertilización de óvulos de cerda, fueron los reportados por Polge et al. (68) en 1970, quienes inseminaron marranas con semen congelado y descongelado, usando cirugía para depositar el semen directamente en el útero o en los oviductos.

En 1971, tres grupos de investigadores citados por Pursel (80) reportaron independientemente fertilizaciones exitosas inseminando cerdas con semen de verraco congelado y descongelado depositándolo en el útero via cervix. Muchos de los componentes del proceso de congelación, en estos métodos, variaron ampliamente, sin embargo en todos los procedimientos se usaron bajas concentraciones de glicerol como agente crioprotector y el tiempo de equilibrio fué corto.

En todos los procedimientos para la congelación, anteriormente mencionados, se usó el procedimiento de pastillas hechas sobre hielo seco antes de su almacenamiento en nitrógeno líquido, descrito por Nagase y Niwa en 1964 (58).

2.2. Composición de los diluentes usados en la congelación de semen de verraco

En general los diluentes para congelar semen porcino están formados por: (a) azúcares, (b) proteínas y lipoproteínas (c) soluciones amortiguadoras y (d) glicerol, adicionalmente ácidos o bases pueden ser incluidos para ajustar el pH.

Debido quizá a la carencia de azúcares en el moco estral y a la pobre reserva de energía del espermatozoide (28), los azúcares vienen a formar la mayor parte de los componentes del diluyente (80).

En algunos estudios (88) se han comparado algunos azúcares (arabinosa, manosa, glucosa, lactosa, sucrosa y rafinosa) para observar su efecto sobre la sobrevivencia de los espermatozoides de cerdo después de su congelación por el método en pastillas, la mayor tasa de recuperación entre los azúcares examinados fue obtenida con la glucosa a 315 mm en un diluyente conteniendo 27% de yema de huevo y 7.5% de glicerol, lo que sugiere que la ventaja de usar azúcar depende de los otros componentes del diluyente.

Las proteínas o lipoproteínas protegen al espermatozoide durante la congelación y son provistas generalmen-

te en forma de yema de huevo, leche o caseína. La yema de huevo entera da poca protección a los espermatozoides de cerdo en contra del choque de frío, si la fracción granulosa es removida por centrifugación, se aumenta la capacidad de protección, sin embargo en la fracción sobrenadante quedan proteínas de bajo peso molecular que le proporcionan al espermatozoide una protección parcial contra el choque de frío (80).

El efecto protector de la yema de huevo se debe a que fortifica las membranas de las células vivas por los lípidos polares, este efecto protector se mantiene después de la total remoción de la yema de huevo del medio intercelular demostrándose que existen componentes antichoques los cuales podrían usarse para dar protección al semen (66).

Parece que una proteína presente en el semen de verraco causa la precipitación de las lipoproteínas de la yema de huevo, esta puede ser la razón para el limitado efecto protector de estas sustancias a través del plasmolema del espermatozoide (98).

La caseína también es parcialmente efectiva contra el choque de frío cuando se usa sola, pero cuando se usa con colesterol y fosfatil-serina proporciona una protección mayor (57).

Los principales amortiguadores usados en la congelación de semen porcino son: El Tes-N-Tris (hidroximetil) Meti-2-aminoetensulfónico, el Tris (hidroximetil) aminoetano el Tes-Nak y el citrato de sodio dehidratado. Estas soluciones tienen la función de mantener el pH del diluyente y proporcionar un medio isotónico al espermatozoide (80).

Senegacnik et al. (93) obtuvieron los mejores resultados con diluyentes que contenían bajas concentraciones de electrolitos, descongelando en medios que tuvieran conductividad específica varias veces mayor que los diluyentes para congelar. Concluyen que la concentración y la calidad de los electrolitos de los medios de congelación, influyen en gran parte sobre la vitalidad del espermatozoide de cerdo que ha sido congelado y descongelado.

La concentración de glicerol en los diluyentes usados para la congelación de semen de verraco es muy importante pues mantiene la capacidad fertilizante del espermatozoide. El primer efecto positivo del glicerol sobre la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide fue obtenida por Polge (68) usando un medio para congelar que contenía 3.5% de glicerol.

Scheid (91) usando diferentes concentraciones de glicerol encontró que el incremento de las cantidades de glice-

rol de 0,2,4 y 6% aumentaba significativamente la motilidad de los espermatozoides al descongelamiento, pero este aumento en la motilidad coincidió con una baja en el número de espermatozoides con acrosomas normales.

Aunque las concentraciones de glicerol de 4 a 8% resultaron en un máximo porcentaje de recuperación de la motilidad de los espermatozoides después del descongelamiento, estas mismas concentraciones tienen un efecto negativo sobre la liberación de enzimas, la morfología del acrosoma y la capacidad fertilizante (80).

Wilmot et al. (108) usando concentraciones de glicerol de 2.5, 5, y 7.5% encontraron los mejores resultados con la concentración del 5% si el periodo de enfriamiento se extendía de una a dos horas.

En la actualidad es común el uso del glicerol en los medios para congelar semen de verraco en una concentración del 1 al 2% (36).

La introducción en el diluyente de sustancias, que actúan en la superficie celular, resulta en la dispersión de los conglomerados de yema los cuales se forman inmediatamente después de la dilución; este fenómeno aumenta el efecto estabilizador de la membrana del espermatozoide por la

lipoproteína de la yema de huevo, aumentando el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con el borde acrosomal normal después de la descongelación. Una de estas sustancias es la pasta de orvus (OEP) (98), la cual mejora la fertilidad (77,80,90,91).

La adición de OEP al diluyente para congelar Beltsville-5 (BF5) aumenta la capacidad fertilizante de los espermatozoides por el incremento de la crioprotección a las células por la sustancias del diluyente (79).

Rillo et al. (83) confirmaron el efecto positivo de la OEP tanto sobre el mejoramiento de la motilidad como sobre el aumento del porcentaje de células que conservan su acrosoma intacto.

Desde el inicio de la inseminación artificial con semen de cerdo congelado, se han venido usando una gran cantidad de diluyentes o medios para congelar: yema de huevo y glucosa (68,82,108) el diluyente para congelar Beltsville 3 (BF3) que contiene 4% de lactosa, 2% de caseína, 2% de Tris hidroximetil-aminoetano, 1% de ácido cítrico, 0.5% de fructosa, 0.1 g de estreptomina y 1000 UI de penicilina (53,73).

En 1973, Salamon (8) describió algunos diluyentes

compuestos de leche. El diluyente de leche, que contiene 10% p/v de leche descremada y el diluyente de leche-glucosa.

Wilmut et al. (108) describen un diluyente compuesto de yema de huevo y 180 mM de inositol con glicerina.

La mayor cantidad de reportes son los que se refieren al diluyente descrito por Pursel y Johnson (77) conocido como diluyente para congelar Beltsville 5 (BF5) el cual ha sido ampliamente usado (38,39,71,78,79,102). Este diluyente contiene; Tes-N-Tris (hidroximetil) ácido sulfónico metil-2-aminoetano, Tris (hidroximetil) aminoetano, Dextrosa anhidra, yema de huevo, pasta de Orvus y glicerol

Otro de los diluyentes muy usados es el TFE, Tris-fructosa EDTA el cual tiene esta composición: 250 mM de Tris, 111 mM de fructosa, 75 mM de ácido cítrico, 15 mM de sal disódica EDTA y 15% (v/v) de yema de huevo (53,64,65).

Osinowo y Salamon (64,65) describen el diluyente S-1 y el diluyente S-2 compuestos por 250 mM de Tris, 75 mM de ácido cítrico, 15 mM de EDTA y 1% (p/v) de caseína.

Algunos investigadores (57) usan una solución buffer que contiene 40 mM de Tes, 17 mM de Tris y 180 mM de glucosa con 20% de yema de huevo o 2% de caseína o 2% de caseí

na con 2.5% de fosfatil serina y 10 mM de colesterol.

El medio Hülseberg (90, 91) es usado cuando se congela el semen en popotes y contiene 11% de lactosa, 20% de yema de huevo 1.5% de pasta de orvus y 2% de glicerol.

Otro medio es el Tris-Fructuosa-Acido cítrico-Yema de huevo que contienen un 6.4% de glicerina (23, 102).

Es una revisión de literatura sobre congelación de semen de cerdo se menciona que el diluyente más usado es el Tris-Glucosa-Yema de huevo al 20% y glicerol de 1-2% (36).

Konov y Narizhnyl (46) describen un diluyente usado para la congelación de semen porcino que contiene; sacarosa, glucosa, sal disódica EDTA, hidróxido de potasio, óxido de Ca y 50 ml de yema de huevo.

2.3. Procedimientos para congelar semen de verraco

Existen un gran número de procedimientos para congelar semen de cerdo, uno de los más conocidos es la técnica de Beltsville (77, 79, 80) la cual es como sigue: La porción rica del semen de colecta en un recipiente térmico y se deja a temperatura ambiente durante dos horas; en este tiempo la temperatura del semen desciende a la temperatura del cuarto,

(20 C) enseguida el semen es colocado en tubos y es centrifugado a 300 gravedades durante 10 minutos al final el semen se separa del plasma seminal y los espermatozoides son resuspendidos hasta contener 1.2×10^9 espermatozoides por ml con el diluyente para congelar (BF5), el semen así diluido es enfriado a 5°C en un período de 2 horas, dentro de un refrigerador. Una vez enfriado se le añaden 5 ml de BF5 que contiene 2% de glicerol; los espermatozoides son enseguida congelados en forma de pastillas sobre hielo seco y almacenados en nitrógeno líquido a -196 °C.

Otro método muy utilizado en alemania es el congelamiento del semen en tubos grandes de plástico (90, 91) se obtiene todo el eyaculado con excepción del gel, el semen se diluye en dos partes con el diluyente Hulsenberg a 34°C y es enfriado enseguida en un baño de agua a 15 °C por período de tres horas y conservado a esta temperatura durante 3 horas más. El semen es después centrifugado a 15 °C por 8 minutos a 800 gravedades y el sobrenadante es decantado, los espermatozoides son resuspendidos con un diluyente que contiene 11% de glucosa y 20% de yema de huevo hasta obtener 0.8×10^9 espermatozoides por ml, este medio contiene 1.8% de glicerol; 5 ml de semen así diluido son colocados en tubos de plástico, los tubos son congelados en vapor de nitrógeno líquido y almacenado en un termo con nitrógeno.

Aunque estos procedimientos difieren en algunos detalles se mantienen varios principios: a) Los espermatozoides de cerdo desarrollan resistencia al choque de frío cuando son incubados, el desarrollo de ésta característica es inherente de la célula sexual, la presencia de líquido seminal incrementa esta resistencia, posiblemente por la interacción de la membrana celular con las proteínas del plasma seminal (80).

En el procedimiento de Beltsville, las dos horas de almacenamiento permiten al espermatozoide desarrollar esta característica. En el otro método para congelar, ésta resistencia posiblemente, se desarrolla durante el enfriamiento y el almacenamiento al 15 °C.

b) El segundo principio es la remoción del plasma seminal antes del enfriamiento por debajo de los 15 °C, lo que permite que el espermatozoide sea resuspendido a altas concentraciones.

c) La congelación de los espermatozoides debe hacerse en forma concentrada lo que permitirá su descongelación en escasos segundos (80).

En un estudio hecho para comparar los métodos para la congelación en pastillas y pajillas (67), no se encontraron

diferencias en motilidad y el porcentaje de acrosomas intactos fue de 42.5 para el semen congelado en pastillas y de 38.0% para el semen congelado en pajillas. La tasa de concepción fué significativamente diferente 48% para las pastillas y 65% para las pajillas.

Qui et al. (82) describen el método de congelación en pastillas con una variable. Las pastillas se hacen en una malla de cobre que se coloca sobre el nitrógeno líquido y en ella se deposita el semen diluido

2.4. Métodos y medios para descongelar el semen de verraco que ha sido congelado

Los métodos para descongelar el semen de cerdo que ha sido congelado caen en dos categorías:

a) Descongelamiento en un vaso caliente sin la dilución simultánea de los espermatozoides.

b) Descongelamiento del semen en una solución caliente, descongelando y diluyendo el semen simultáneamente.

Este último procedimiento parece ofrecer mayores ventajas debido a que la solución caliente cubre toda la super-

ficie de las pastillas con la aceleración del ritmo de descongelamiento y un incremento en la sobrevivencia de los espermatozoides (80).

Otros autores (87, 88) han obtenido mejores resultados con el sistema de descongelación en seco, subrayando que es mejor el uso de una temperatura entre 50 y 60°C.

Respecto a la temperatura para descongelar la mayoría de los investigadores han encontrado óptimos resultados descongelando a 50 °C. (9, 36, 37).

Cuando se usa el sistema de popotes para congelar el semen de cerdo se usan dos procedimientos para descongelar:

a) Descongelar colocando los popotes en una caja de poliestreno vacía durante tres minutos dejándolos a temperatura ambiente.

b) Descongelar los popotes en un baño de agua a 50°C durante 50 segundos (90).

En ambos métodos el semen se diluye después del descongelamiento.

El uso de diluentes para descongelar el semen de por-

cino se ha estudiado ampliamente desde el uso del plasma seminal el cual dió buenos resultados (10).

Se han hecho comparaciones entre el plasma seminal y otros diluentes para descongelar el semen de verraco congelado obteniéndose resultados variables dependiendo del medio usado para congelar (64, 65).

En varias investigaciones (48, 49, 50, 51) se compararon varias soluciones descongelantes, el plasma seminal completo, el plasma seminal sin protefinas, el medio OLEP (composición basada en análisis físicos y bioquímicos del plasma seminal) y una solución glucosada isotónica. Los tres primeros medios produjeron resultados similares mientras que la solución glucosada isotónica produjo pobres resultados.

Otros autores (11, 57) han encontrado que algunas protefinas básicas del plasma seminal se enlazan con el espermatozoide durante la eyacuación y en el proceso de enfriamiento promueven que la membrana del espermatozoide se rompa. Para probar la importancia de este hecho Moore y Hibbit (57) quitaron las vesículas seminales a verracos usados en la IA y los sometieron a una prueba de fertilidad, los resultados mostraron solo una pequeña diferencia a favor de los verracos sin vesículas seminales, la cual no fué significativa, lo que indica que la presencia o ausencia de vesículas semi-

nales solo tiene un pequeño efecto sobre la habilidad fertilizante de los espermatozoides de verraco congelados y descongelados en un medio adecuado.

Los niveles de electrolitos, el pH y la presión osmótica de los medios usados para descongelar, parecen ser factores de importancia para la sobrevivencia de los espermatozoides de cerdo que han sido congelados y descongelados y para el mantenimiento de su capacidad fertilizante (48).

La influencia de la presión osmótica del diluyente para descongelar se estudió utilizando varios diluentes: lactosa, BTS (Solución descongelante Beltsville), y cloruro de sodio a las presiones osmóticas de 500, 450, 400, 350, 300 y 250 MOsm. Los resultados obtenidos demuestran en todos los casos un incremento en la motilidad espermática al disminuir la presión osmótica siendo mejores las presiones de 300 y 250 MOsm. Contrariamente, el mayor número de espermatozoides con acrosomas normales se encuentra entre las presiones osmóticas de 350 y 400 MOsm (85).

Otros autores (93) han obtenido mejores resultados durante el descongelamiento de espermatozoides de verraco cuando los medios para descongelar tienen una conductividad espe

cífica varias veces mayor que los medios usados durante el congelamiento.

El medio para descongelar semen de verraco más usado parece ser el BTS (38, 39, 77, 80).

3.0. Uso de sustancias adicionadas al semen.

Las sustancias adicionadas al semen con el objeto de mejorar su fertilidad han sido estudiadas ampliamente desde hace años y han variado desde hormonas hasta formaldehído.

3.1. Oxitocina, Carbacolina.

Baker et al. (4) probaron que el uso de carbacolina u oxitocina en el semen de verraco, no tiene efecto si las cerdas se inseminan con una dosis de 20 ml de semen. La carbacolina incrementó significativamente el número de espermatozoides recuperados de los oviductos cuando se inseminaba con 100 ml de semen. La oxitocina usada en este mismo volumen de semen no tuvo efecto.

Recientes investigaciones con un análogo de la oxitocina, el MeDCOT-1, muestran que la oxitocina no tiene efecto sobre la tasa de concepción, pero si reduce el tamaño de la camada cuando se usa adicionado al semen (63).

3.2. Progesterona

Becerril (5) agregando 5 mg de progesterona cristalina al semen diluido de verraco, encontró que el número de animales gestantes era mayor en animales inseminados con semen tratado, que en aquellos animales inseminados con semen al que no se le había añadido esta hormona. El tratamiento con progesterona no incrementó el número de espermatozoides recuperados en la unión uterodúbarica.

El uso de las hormonas esteroides para tratar de incrementar el tamaño de la camada en la cerda no se ha reducido a su adición al semen. Se han hecho numerosos estudios aplicando estas hormonas por vía parenteral en diferentes etapas de la gestación, sin embargo, los resultados han sido conflictivos. Sammelwitz et al. (89) trataron cerdas primerizas con progesterona a dosis de 50, 100, 200 y 400 mg diariamente por 26 días después de la monta con un pequeño efecto benéfico. Después han habido otros trabajos en los que aumentando al doble el nivel de progesterona en el plasma o reduciéndolo a la mitad, no encontraron que tuviera efecto sobre la sobrevivencia embrionaria (27, 96, 104).

La combinación de progesterona y estrógenos en una relación de 2000:1 aplicada en dosis de 25 mg de progesterona y 12.5 µg de estrona han sido reportados que incrementan el

tamaño de la camada al término, cuando se aplican entre los días 14 al 23 ó en los días 16 y 17 que corresponden al período de implantación (14, 107).

3.3. Prostaglandinas

Las prostaglandinas como aditivos del semen también han sido objeto de estudio. Kozumplik (47); encontró que la adición al eyaculado de un análogo sintético de la prostaglandina F2 alfa, usada en diferentes concentraciones no tuvo efecto sobre la motilidad de los espermatozoides o sobre la morfología del acrosoma, con la excepción de la concentración más alta (5000 ng/ml) la que redujo significativamente la motilidad espermática. De la misma manera Kelly (43) encontró que las prostaglandinas de las series E y F deprimen la respiración de los espermatozoides pero no afectan la producción de lactato, por lo que se piensa que el efecto de las prostaglandinas F y E puede ser negativo.

Niwa et al. (61) usando 6 mg/3ml de prostaglandina F2 alfa en 5 ml de semen de verraco diluido obtuvieron una tasa de concepción mayor para el grupo así tratado que para el grupo testigo. No hubo diferencias entre los grupos en términos de tamaño de la camada y el número de lechones nacidos vivos.

Mamon et al. (56) suplementando al semen de conejo,

mono y carnero con prostaglandinas obtuvieron un mayor número de espermatozoides recuperados del oviducto y un incremento en la motilidad medida con una cámara de TV y por el número de espermatozoides que pasan a través de un filtro.

3.4. Formaldehído

Dott et al. (15) probaron que los espermatozoides preservados en bajas concentraciones de formol in vitro recuperaban su motilidad cuando el formol era removido y conservaban sus membranas intactas. También lograron fertilizaciones usando el semen así tratado para inseminar marranas. Se sugiere que tratar los espermatozoides con bajas cantidades de formaldehído antes del congelamiento puede ser una manera de evitar los cambios que ocurren en la membrana durante este proceso.

III. MATERIAL Y METODOS

1.0. Animales experimentales

Todos los animales que se utilizaron en este experimento fueron de la Granja Experimental Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizada en el km, 21.5 de la carretera México-Tulyehualco en las coordenadas de 19°18' de latitud norte y 99°02' de longitud este (22).

Se utilizaron 39 cerdas primerizas híbridas, de 6 a 8 meses de edad con un peso de 90 a 110 kg y un verraco de la raza Landrace, adulto de fertilidad probada.

Los animales fueron mantenidos en total confinamiento y sujetos al mismo régimen de alimentación y manejo.

Las hembras del experimento fueron tomadas del grupo de engorda de la granja, alojadas en corrales en grupos de 8 a 10 hembras, vacunadas y aretadas para su identificación y observadas diariamente con un verraco recelador. Solo las 39 hembras que mostraron calor fueron conservadas para el experimento, las cerdas que no mostraron su primer celo dentro de las primeras tres semanas se eliminaron de este trabajo y fueron enviadas al rastro.

2. Grupos experimentales

Las hembras fueron numeradas del 1 al 39 para series asignado un tratamiento por sorteo, de tal manera que se die ran los tratamientos completamente al azar, se utilizaron 13 cerdas por cada tratamiento.

Los grupos experimentales fueron tres:

El grupo 1 recibió dos inseminaciones con semen conge lado y descongelado que fué tratado con 5 mg de progesterona cristalina (4-pregnen-3,20-diona)* adicionada al semen antes de la congelación al momento de diluir el semen con 5 ml de BF5 con el 2% de glicerol.

El grupo 2 recibió dos inseminaciones con semen conge lado y descongelado al que se le añadieron 5 mg de progesterona inmediatamente después de la descongelación en ambos ca sos se utilizó 0.01 ml de glicerol como vehículo para la progesterona.

El grupo tres considerado como testigo recibió dos inseminaciones con semen congelado y descongelado al que no se le añadió ninguna cantidad de progesterona.

* Química Esteroidal S.A. de C.V.

Todas las cerdas fueron inseminadas con 6×10^9 espermatozoides diluidos en 40 ml de solución descongelante Beltsville (BTS) (cuadro 3), solo se usó semen congelado en pastillas según el método descrito por Pursel y Johnson (77).

3.0. Procedimiento experimental

3.1. Colección de Semen

El semen usado en este trabajo se obtuvo de un verraco adulto de la raza Landrace. El verraco se seleccionó para este experimento porque su semen mostró mejor recuperación de la motilidad y menos daño acrosómico después del proceso de congelación y descongelación que el semen de otros cuatro verracos que también se procesó para comparar su resistencia a la congelación.

La colección y procesamiento del semen se hizo una vez por semana durante 14 semanas. El semen fue colectado, usando la técnica de la mano enguantada (33, 86). Cada eyaculado produjo un promedio de 6 dosis que se dividieron en tres grupos de tratamientos (ya descritos).

CUADRO 2

COMPOSICION DEL DILUYENTE BELTSVILLE F5

INGREDIENTE	CANTIDAD (g)
Tes-N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoten sulfónico.....	1.2
Tris (hidroximetil) aminoetano.....	0.2
Dextrosa anhidra.....	3.2
Yema de huevo (ml).....	20
Pasta de Orvus (ml).....	0.5

Completar a 100 ml con agua destilada, centrifugar a 12 000 gravedades por 10 minutos y decantar.

COMPOSICION DE LA SOLUCION DESCONGELANTE BELTSVILLE

INGREDIENTE	CANTIDAD (g)
Dextrosa anhidra.....	3.7
Citrato de sodio dihidratado.....	0.6
Bicarbonato de sodio.....	0.125
Tetraacetato disódico etilendiamino.....	0.125
Cloruro de potasio.....	0.075

Los ingredientes se disuelven y aforan hasta 100 ml con agua destilada.

Tomado de Pursel y Johnson

(77)

3.2. Evaluación del semen fresco

Todos los eyaculados se evaluaron en el laboratorio de la granja inmediatamente después de colectados. Se midió la motilidad, concentración y morfología (86), esta última se evaluó tomando una muestra de semen que se conservo en solución de Hancock (13, 33, 99) para su posterior evaluación. Solo el semen que mostró una motilidad mayor del 70%, menos del 5% de espermatozoides con acrosomas anormales evaluados en un microscopio de contraste de fase, menos del 5% de cabezas anormales y menos del 10% de gota citoplasmática fue usado (5).

3.3. Procedimiento de congelación

El semen se congeló de acuerdo al método descrito por Pursel y Johnson (77) el que es como sigue; El semen se dejó durante 105 minutos en el vaso donde fue colectado durante los cuales la temperatura del semen disminuyó gradualmente hasta adquirir la temperatura del cuarto (20-24°C). El semen se separó en alicuotas de 6×10^9 espermatozoides móviles y se colocaron en tubos para centrifuga de polipropileno de 17 x 100 mm y se centrifugaron a la temperatura del cuarto a 300 gravedades durante diez minutos. El plasma seminal sobrenadante se removió de cada tubo por aspiración y los espermatozoides fueron resuspendidos hasta un volumen de 5 ml con el diluyente para congelar Beltsville F5 (Cuadro 3).

Los espermatozoides así diluidos fueron enfriados hasta una temperatura de 5 °C durante un periodo de dos horas colocando los tubos con el semen diluido en un vaso de precipitado de 250 ml conteniendo 50 ml de agua a la temperatura del cuarto, el vaso fue colocado dentro de un refrigerador con temperatura de 5 °C. Después de las dos horas, el semen fue diluido con 5 ml de BF5 conteniendo 2% de glicerol. En este momento se le agregó la progesterona a un tercio de las dosis obtenidas. A los otros tubos solo se les agregó el BF5 con el 2% de glicerol sin adición de progesterona el contenido de los tubos fue mezclado por inversión y colocado en una jeringa para proceder a congelar el semen en pastillas de 0.15 a 0.2 ml sobre hielo seco de acuerdo con el método de Nagase y Niwa (58). Las pastillas se colocaron en una caja con nitrógeno líquido para ser envasadas en popotes de plástico después de lo cual se introdujeron a un termo con nitrógeno para su almacenamiento.

3.4. Procedimiento para descongelar

Para cada inseminación se tomó una dosis de semen congelado contenida en un popote, las pastillas fueron vaciadas en una caja de poliestireno (dimensiones interiores; 152 mm de largo por 97 mm de ancho y 137 mm de profundidad) y dejadas a temperatura ambiente durante 180 segundos, las pastillas fueron vaciadas enseguida en un vaso de precipitado de

250 ml conteniendo 25 ml de la solución descongelante Belstville (Cuadro 2) precalentada a 50°C, las pastillas en la solución fueron agitadas suavemente en el vaso y se descongelaron entre 20 a 30 segundos.

El semen se colocó en una botella plástica para inseminación y el vaso de precipitado fue enjuagado con 15 ml de BTS y la solución fue añadida a la botella para inseminar, en este momento se añadió 5 mg de progesterona si la cerda a inseminar pertenecía al grupo 2.

La botella se cubrió con papel para evitar el efecto de la luz sobre el semen.

3.5. Evaluación del semen descongelado

Inmediatamente después de que el semen fue descongelado y tratado, se evaluó la motilidad inicial en un microscopio de luz 40 X. Se tomaron dos gotas de semen que fueron fijadas en un ml de solución salina de formol Hancock (12, 33, 99) para ser evaluado el daño acrosomal posteriormente, otra muestra de semen de un ml se colocó en un baño María a 37°C durante 30 minutos después de los cuales se evaluó la motilidad en un microscopio de luz (74, 99).

La morfología del acrosoma fue evaluada dentro de una

semana posterior al descongelamiento, con un microscopio de contraste de fases a 1000x y los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo al daño acrosómico en 5 clases según las describen Pursel et al. (74): NAR: si la capa acrosomal se adhiere suavemente al núcleo y posee un borde apical liso. NAR: estos espermatozoides son morfológicamente similares que los anteriores excepto por la adherencia de partículas pequeñas a la capa acrosomal. DAR: estos espermatozoides se identificaron como los que tenían el borde posterior de la cresta apical más amplio y tenía forma irregular. MAR: son espermatozoides que perdieron la cresta apical, pero la capa anterior del acrosoma permanece estrechamente adherida a la cabeza del espermatozoide. LAC: fueron los espermatozoides caracterizados por vesiculación del capuchón acrosomal anterior.

3.6. Momento y técnica de inseminación

Las cerdas fueron observadas, para la detección de estro, dos veces diarias, a las 8:00 y a las 18:00 utilizando un verraco detector, y haciendo la prueba de cabalque (45). Se llevó un registro de la hora en que las marranas entraban en calor en su segundo estro para ser inseminadas dos veces, la primera inseminación la recibieron 24 horas después de de tectado el estro y la segunda 10 horas después. Las insemina ciones fueron intracervicales usando un cateter de hule espi-

ral según la técnica descrita por Melrose (55) y fueron hechas en presencia de un verraco para estimular a la hembra.

3.7. Evaluación de la fertilidad

Se observaron las cerdas que habían sido inseminadas con semen congelado y descongelado, de los 18 a los 23 días para determinar si repetían el estro. Aquellas que no mostraron señales de celo se sometieron a una prueba de preñez con un aparato de ultrasonido a los 30 días después de la IA (100). Las cerdas confirmadas gestantes fueron enviadas al rastro para su sacrificio, se recogieron los úteros y el número de embriones y cuerpos lúteos fueron registrados. Las hembras diagnosticadas como no gestantes también fueron enviadas al rastro y los úteros revisados para ver si tenían alteraciones.

3.8. Análisis estadístico

Los porcentajes de fertilidad fueron analizados por medio de la distribución de χ^2 (94, 103), los datos de número de embriones fueron transformados a raíz cuadrada antes del análisis de varianza mediante la fórmula $\sqrt{x+1}$ (94). Los valores correspondientes a motilidad inicial, motilidad a los 30 minutos y las diferentes categorías de morfología fueron transformados al arcoseno, específico para valores propor

cionales por la formula $p = 2 \arccos \sqrt{F}$ (60) y sometidas también a análisis de varianza para determinar si existían - diferencias entre las medias debidas al tratamiento.

La motilidad inicial y la motilidad a los 30 minutos de incubación a 37 grados centigrados se analizaron para - ver si había correlación entre ambas evaluaciones (103).

IV RESULTADOS

La fertilidad obtenida mediante la inseminación artificial con semen congelado y descongelado de verraco en marranas primerizas se muestra en el cuadro 3. Se observa una diferencia porcentual entre el grupo de cerdas inseminadas con semen al que se le adicionó progesterona después del descongelamiento y el grupo testigo. Sin embargo el análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa ($P > .05$). No se observó diferencia entre los grupos en cuanto al número de ovulaciones (cuerpos luteos presentes en el ovario) Cuadro 4. Se puede observar también una aparente diferencia en el número de embriones por cerda a favor del grupo al que no se le agregó progesterona al semen. No obstante, no se encontró que la diferencia se debiera al tratamiento.

En cuanto a la motilidad medida inmediatamente después de la descongelación, se encontró que siempre fué más baja que la motilidad medida 30 minutos después (Cuadro 5).

No existió efecto del tratamiento sobre motilidad inicial ni sobre la motilidad después de 30 minutos de incubación (cuadro 5).

CUADRO 3

FERTILIDAD OBTENIDA EN CERDAS PRIMERIZAS INSEMINADAS DURANTE SU SEGUNDO ESTRO CON SEMEN CONGELADO Y DESCONGELADO (n = 13)

TRATAMIENTO	No. DE CERDAS NO GESTANTES	No. DE CERDAS GESTANTES	% DE FERTILIDAD
Doble inseminación con semen congelado y descongelado con adición de 5 mg. de progesterona antes del congelamiento	6	7	53.84 ^a
Dobel inseminación con semen congelado y descongelado con adición de 5 mg de progesterona después del descongelamiento	7	6	46.15 ^a
Doble inseminación con semen congelado y descongelado sin adición de progesterona	5	8	61.53 ^a

n = Número de cerdas inseminadas por grupo.

a = No se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los porcentajes de fertilidad

CUADRO 4

PROMEDIO DE CUERPOS LUTEOS Y PROMEDIO DE EMBRIONES OBTENIDOS EN CERDAS PRIMERIZAS INSEMINADAS CON SEMEN CONGELADO Y DESCONGELADO SACRIFICADAS A LOS 35 DIAS DE GESTACION

TRATAMIENTO	No. DE CERDAS GESTANTES	No. de C.L. OV. DERECHO (\bar{X} \pm D.E.)	No. DE C.L. OV. IZQUIERDO (\bar{X} \pm D.E.)	No. DE EMBRIONES POR CERDA (\bar{X} \pm D.E.)
Doble inseminación con semen congelado y descongelado con adición de 5 mg de progesterona antes del congelamiento	7 (13) ^a	5.85 \pm 1.36	6.42 \pm 1.12	5.71 \pm 1.17 ^b
Doble inseminación con semen congelado y descongelado con adición de 5 mg de progesterona después de la descongelación	6 (13)	6.66 \pm 1.69	6.66 \pm 1.67	6.83 \pm 1.46
Doble inseminación con semen congelado y descongelado sin adición de progesterona	8 (13)	6.5 \pm 1.33	6.37 \pm 1.46	8.25 \pm 1.8

a = Número de cerdas inseminadas por grupo

b = No se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$) entre las medias del número de embriones

EFFECTO DE LA ADICION DE PROGESTERONA SOBRE LA MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO QUE HAN SIDO CONGELADOS Y DESCONGELADOS (n = 26)

TRATAMIENTO	MOTILIDAD INICIAL	MOTILIDAD A LOS 30 MIN.*
	$\bar{X} \pm$ D.E.	$\bar{X} \pm$ D.E.
Semen congelado y descongelado con la adición de 5 mg de progesterona antes del congelamiento	8.42 [±] 1.97 ^a	45.38 [±] 2.8 ^b
Semen congelado y descongelado con la adición de 5 mg de progesterona después del descongelamiento	7.26 [±] 1.65 ^a	40.57 [±] 2.76 ^b
Semen congelado y descongelado sin la adición de progesterina	7.26 [±] 1.94 ^a	40.19 [±] 2.88 ^b

Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.01)

* El semen fue incubado a 37°C durante 30 minutos después de ser descongelado

CUADRO 6

EFFECTO DE LA ADICION DE PROGESTERONA AL SEMEN DE VERRACO SOBRE LA MORFOLOGIA ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES QUE HAN SIDO CONGELADOS Y DESCONGELADOS (n = 26)

TRATAMIENTO	NAR ¹	DAR ²	MAR ³	LAC ⁴
Semen congelado y descongelado con la adición de 5 mg de progesterona antes de la congelación	50.53 ± 2.95	25.5 ± 2.6	8.42 ± 1.63	15.46 ± 2.03
Semen congelado y descongelado con la adición de 5 mg de progesterona después del descongelamiento	49.69 ± 2.9	23.26 ± 2.42	9.00 ± 1.65	18.66 ± 2.47
Semen congelado y descongelado sin la adición de progesterona	46.85 ± 3.39	26.53 ± 2.89	10.0 ± 1.83	16.61 ± 2.44

Los valores están expresados en porcentajes promedios ± desviación estándar. No se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos (P > 0.05)

1 NAR = Borde apical normal

2 DAR = Borde apical dañado

3 MAR = Perdiendo el borde apical.

4 LAC = Capa acrosomal perdida

La correlación entre la motilidad inicial del semen y la motilidad después del periodo de incubación es muy baja ($r = 0.15$) en todos los grupos por lo que se hace necesario obtener el porcentaje de motilidad del semen a los 30 minutos de incubación para tener una buena medida de la recuperación de la motilidad.

En el cuadro 6 son presentados los resultados referentes a la morfología espermática. Las categorías en que se clasificaron las distintas formas del acrosoma se redujeron de 5 a 4 eliminando la clase NAR' (espermatozoides con acrosoma normal conteniendo gránulos) debido a que el porcentaje de espermatozoides con esta característica fue muy reducido en todos los casos, por lo que los espermatozoides de esta categoría se sumaron a los espermatozoides con acrosoma normal (NAR) para su evaluación estadística. No se encontró diferencia entre ninguna de las categorías morfológicas del acrosoma debido al tratamiento con progesterona después del análisis de varianza ($P > 0.05$).

Se encontró que el choque de frío produce algún tipo de daño en casi el 50 por ciento de los espermatozoides independientemente del tratamiento.

V. DISCUSION.

Como se puede observar en cuadros 3 y 4 en el presente trabajo, se obtuvo una tasa de concepción del 53.8% en promedio en todas las hembras inseminadas y una media de 6.93 lechones por cerda a los 35 días de gestación. En ninguno de los casos se encontró diferencia estadística entre los grupos debido al tratamiento con progesterona. En el caso de la tasa de concepción los resultados coinciden con Becerril (5) que tampoco encontró diferencias en este aspecto, pero en el caso del número de lechones por hembra, se difiere de los resultados encontrados por ese autor que menciona que la progesterona añadida al semen diluido cuando se tienen bajas concentraciones de semen, puede aumentar el número de lechones por camada.

Es posible que el no encontrar efecto de la progesterona se deba a que el momento de la inseminación coincide con una disminución de la cantidad de receptores citosólicos para la progesterona en el útero (97). Hunter (30) encontró que la relajación de los tejidos edematosos del istmo y de la unión uterotubárica ocurrió después de la inyección local de la progesterona, lo que dió lugar a fertilizaciones poliespéricas de los óvulos, esto podría explicar el porqué la disminución del número de embriones en el caso del semen tratado con progesterona, porque las fertilizaciones de este tipo ter

minan en muerte embrionaria temprana.

Las tasas de parto y el tamaño de la camada siempre han sido los factores más importantes para medir la eficiencia reproductiva (69) es por eso que se comparan los hallazgos en este campo para determinar la validez de este trabajo. Se considera que las tasas de fertilización en el ganado porcino son del 95 al 100 por ciento según lo mencionan Pope y Firts (70) y Polge (69) con un 30 a 40 por ciento de muerte embrionaria antes de los 45 días de gestación. Los promedios de muerte embrionaria en el presente trabajo excedieron estos límites. En el caso del grupo al que se agregó progesterona al semen antes de la congelación, el promedio de muerte embrionaria fué del 53.5% mientras que para el grupo al que se le añadió progesterona después del descongelamiento el promedio fué del 48.73 y del 35.9 por ciento de embriones para el grupo testigo, esto si se considera que por cada cuerpo lúteo en el ovario se debe encontrar un embrión (70).

Sin embargo Pursel et al. (78) trabajando con semen congelado solo encuentran 51 óvulos fertilizados de un total de 116 y en otro trabajo el mismo Pursel (80) menciona que el porcentaje de fertilización usando semen congelado no es del 90 al 100 por ciento sino del 60 al 89 por ciento. En este caso los hallazgos de este trabajo están más acordes con estos valores y se encuentran dentro de lo esperado para el caso de cerdas primerizas inseminadas con semen que ha sido

congelado y descongelado por el método de Beltsville.

Los promedios de fertilidad obtenidos en este trabajo son similares a lo encontrado por autores que han trabajado con semen congelado, pero están por debajo de aquellos reportados usando semen fresco o diluido o de los obtenidos por la monta natural en la que se reportan valores de un 85% de tasa de concepción y una media de 11 lechones por camada (69), en el caso del semen fresco o diluido la tasa de concepción es del 73% y 9.5 lechones por camada (61). Johnson encontró valores para semen fresco del 62 al 98% de concepción. Otros mencionan que han encontrado valores del 60.5% de concepción con 9.8 lechones usando semen diluido para la IA (37).

Los resultados de fertilidad para los espermatozoides de cerdo que han sido congelados y descongelados por los métodos usuales, son menores que aquellos obtenidos usando semen no congelado (8) por el procedimiento Beltsville las tasas de preñes varían del 43 al 71% con un promedio de 80 lechones por camada (38). Pursel menciona que la falla en la fertilización es la principal causa de la baja tasa de concepción y el tamaño de la camada de cerdas inseminadas con semen congelado y descongelado (80).

Encontramos informes de fertilidad tan bajos como los obtenidos por Pursel et al. (81) que mencionan una ta-

sa de partos del 37.2% con una camada promedio de 7.5 lechones para cerdas primerizas inseminadas con semen congelado y descongelado. Moore y Hibbit (57) lograron una tasa de concepción del 35%. Pacova et al. (67), mencionan un promedio de partos del 37.5% con un tamaño de camada de 8.6 lechones, mientras Ibrahim (35) obtiene un porcentaje de partos del 43.3%.

Otros mencionan tasas de parto que van por arriba del 50 por ciento tales como Torbjørn y Stavne (99) que obtuvieron una tasa de partos del 64.5% con 9.37 lechones por camada. En nuestro país Garbuno (23) obtuvo un 60% de fertilidad con un promedio de 4.4 lechones por camada con una sola inseminación. Otros (62) obtienen tasas de concepción del 56.5% con 7.8 lechones por camada.

En varios experimentos usando el medio para congelar BF5 Maxwell y Salamon (53) obtienen una tasa de concepción del 50% con 9.4 lechones por camada.

Johnson (40) reporta una tasa de concepción, recuperando los embriones a los 28 días de gestación de cerdas primerizas del 54.7% con un promedio de 8.9 lechones por cerda, este reporte es muy similar al nuestro el cual se encuentra también dentro de los valores mencionados por Corteel y Paquignon (9) los que dicen que el promedio de partos usando

semen congelado y descongelado oscilan entre el 47 al 65%.

En este trabajo inicialmente se evaluó la morfología del acrosoma en 5 categorías que describen Pursel et al. (74) se encontró que a la observación del semen, una de las categorías (NAR') aparecía con una muy baja frecuencia (0.58%) por esta razón se eliminó de la evaluación estadística. Pursel et al. (74) encontraron que la categoría NAR' estaba hasta en un 16% pero ellos evaluaron el semen que había estado incubado a diferentes temperaturas y no congelado.

Las observaciones de este trabajo en este aspecto están de acuerdo con otros autores que evaluando semen congelado y descongelado solo toman en consideración cuatro categorías eliminando la categoría NAR' (75,76).

Los valores que se encontraron para las diferentes categorías del semen, así clasificado, están de acuerdo con los informados por Johnson (38,39) que encuentra un 45% de espermatozoides con acrosomas normales. El mismo Johnson (40) en un trabajo reciente encuentra que los espermatozoides se distribuyen en los siguientes porcentajes NAR 49%, DAR 18%, MAR 14% y LAC 19% los cuales son valores semejantes a los encontrados en este trabajo. De cualquier manera en los datos que se tienen sobre morfología del acrosoma, observamos que esta se mantiene en rangos del 44 al 57% de esperma

tozoides con borde apical normal (12,72,92,99).

En este trabajo los espermatozoides fueron fijados en solución de Hancock y se notó que no altera la morfología del acrosoma. Estos hallazgos están de acuerdo a lo que menciona Hurtgen et al. (34) que encuentra que la fijación del semen con una solución salina formolada no tuvo influencia sobre la morfología del espermatozoide.

En este trabajo se encontró que evaluar la motilidad del semen inmediatamente después de descongelado, da resultados muy pobres, menores del 8%, los cuales son parecidos a los mencionados por Potter et al. (71), que encuentran que más del 85% de los espermatozoides sufren una pérdida de la moti-
lidad.

Sin embargo, cuando se evaluó el semen después de un periodo de incubación a 37°C durante 30 minutos se encontraron valores de más del 40%, los cuales son coincidentes con aquellos autores que también usan la prueba de termorresistencia (67,75,80,99). La recuperación de la motilidad lograda por Schiling et al. (42) es del 45%, Torbjørn y Stavne (99) reportan un 48.5% de motilidad, mientras Johnson solo encuentra una motilidad del 35%.

VI CONCLUSIONES

Se concluye que en las condiciones de este trabajo la progesterona no tuvo influencia en ninguno de los parámetros medidos como son la tasa de concepción, el número de embriones la morfología del espermatozoide y la recuperación de la motilidad.

Los valores de la tasa de concepción y el número de embriones que se encontraron están dentro de los límites que han logrado otros investigadores trabajando con semen congelado por el procedimiento Beltsville.

Los métodos para evaluar el semen de verraco que ha sido congelado y descongelado como son la evaluación de la morfología del acrosoma y la prueba de termorresistencia son buenos índices de la calidad del semen, pero no aseguran por sí solos tasas de fertilización altas por lo que se hace necesario encontrar métodos de evaluación del semen altamente correlacionados con la fertilidad.

LITERATURA CITADA

1. Ahmad, M.S., Kim, J.W. Kitts, W.D. and Hacker, R.R.: Fine alterations in the acrosome: The effect of freezing on boar spermatozoa. Korean J. Animal Sci. 25: 260-266 (1983).
2. Alanko, M.: The knobbed sperm defect in boars: Fertility and inheritance of the defect. Proc. 10th. Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, - 521-523, 1984.
3. Austin, C.R. and Short, R.V.: Reproduction in mammals: Vol. 1: Germ cells and fertilization. Second ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.S.A., 1982.
4. Baker, R.D., Dziuk, P.J. and Norton, H.W.: Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. J. Anim Sci. 27: 88-83 (1968).
5. Becerril, J.A.: The effect of progesterone in liquid semen extender on fertility and spermatozoa transport in the pig. Thesis Master of Science. Dept. Vet. Clinical Sci. Iowa State University, Ames, Iowa., 1982.
6. Blom, E.: The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. Atti del VII Simposio Internazionale - di Zootecnia. Milano, Italia. 125-137, 1972.
7. Brown, K.I., Crabo, G.C., Graham, E.F. and Pace, M.M.: Some factors affecting loss of intracellular enzymes from spermatozoa. Cryobiology 8: 220 (1971).
8. China, Ki'an.: A study on the technology of freezing boar

- semen. Pig News and Information 4:(1):47 (1983).
9. Corteel, J. M. and Paquignon, M.: Preservation of the male gamete (Ram, Buck, Boar). Proc. 10th. Inter. Congr. Anim. Reprod. Insem. Artif. Urbana-Champaign, Illinois. 2:20-27, 1984.
 10. Crabo, B. and Einarsson, S.: Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 12: 125-127 (1971).
 11. Crabo, B.G., Larssen, R.E. and K.J. Zimmerman.: Binding of seminal plasma proteins to boar spermatozoa. Proc. - 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid, Spain 3:269-272, 1980.
 12. Crabo, B.C., Palvelko, M.K., Kosco, M.S., Lodhi, L.A. - and Loseth, K.J.: Evaluation of frozen boar semen by surgical insemination, sperm motility and sephadex filtration. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois 2:52-54 1984.
 13. Day, B.N.: Estrus cycle regulation. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign Illinois, 4:1-9, 1984.
 14. De Sa, W.F., Pleumsamran, P., Morcon, C.B. and Dukelow R.: Exogenous steroid effects on litter size and early embryonic survival in swine. Theriogenology 15:(3): 245-255 (1985).
 15. Dott, H.N., Mor, R.M. and C. Polge.: Artificial insemination with spermatozoa in formaldehyde. J. Reproduc.-Fert. 46: 277-279 (1976).
 16. Duane, L. Garner. : In vitro methods for estimating

- fertilizing capacity of sperm cells. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, 4:X 9-15 1984.
17. English, R. P., Willian J. Smith and A. McLean.: La cerda: Como mejorar su productividad. El Manual Moderno. México, D.F., 1981.
 18. Fawcett, Don W.: The mammalian spermatozoon. Dev. Biol. 44: 394-436 (1975).
 19. Flechon, J. E. and R.H.F. Hunter.: Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs and their relationship with the luminal epithelium after mating a scanning electron microscopy study. Tissue & cell. 13:(1): 127-139 (1981).
 20. Foxcroft, G.R., Paterson, A.M., Lancaster, R.L., Reed, H.C.B.: Oestradiol benzoate (OB) or Gonadotrophin (PG600) induce synchronization of oestrus and ovulation in gilts and sows. Proc. 10th. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, 3:321-325, 1984.
 21. Fritzche, J.: Artificial insemination in pig production in the German Democratic Republic. Current status and results. 34th. Meet. Eur. Asoc. Anim. Prod. Madrid Spain, II:35, 1982.
 22. Gallina, A.J.: Contribución al estudio de la inducción y sincronización del estro en cerdas primerizas híbridas con un compuesto a base de Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (PMSG) y Gonadotropina Coriónica Humana (HCG). Porcirama. VIII:(95): 44-45 (1983).
 23. Garbuno, Z.R.: Congelación de semen porcino. Tesis Li-

- cenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1978.
24. Graham, E.F. and M.M. Pace.: Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. Cryobiology. 4: 75 (1977).
 25. Greene, S.T., Boland, M.P., Gordon, L.: Artificial insemination in the post/weaning sow conducted a predetermined time. Pig News and Inf. 6:(2): 174, (abstr.) (1985)
 26. Guthrie, H.D.: Fertility after estrus cycle control using Gonadotrophin and Prostaglandin F2 alpha treatment of sows. J. Anim. Sci. 49: 158-162 (1979).
 27. Haines, C.E., Warnick, A.C., Wallace, H.D. and Edwards G.M.: The effect of level of feeding and progesterone injections on reproductive performance in gilts. J. Anim. Sci. 16: 1099 (Abstr.) (1957).
 28. Henriët, L., Hervat, F., Hulhoven, D. and Seynave, V.: Capacitation, maturation, metabolism and fertilization Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, 3:390-393, 1984.
 29. Hess, E.A., Ludwig, T.M. and H.S. Teague. : Artificial insemination of swine. Ann. Zootch. 8: 31-36 (1956).
 30. Hunter, R.H.F.: Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs. J. Reprod. Fert. 31: 433-444, (1972).
 31. Hunter, R.H.F.: Physiological factors influencing ovulation, fertilization, early embryonic development and

- stabilishment of pregnancy in pigs. Brit. Vet. J. 133: 461-470 (1977).
32. Hunter, R.H.F.: Reproduction of farm animals. Longmas, London & New York. 1982.
 33. Hurtgen, J., Grabo, B.O. and Leman, A.D.: Fertility examination of boars. Proc. Ann. Meet. Soc. for Theriogenology St. Paul, Minn. pages 11-17 (1977)
 34. Hurtgen, J.P., Larssen, R. and B. Crabo.: Factors affecting the semen quality in the boar. Proc. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid, Spain 3:271-274, 1980.
 35. Ibrahim, M.A.R. and Kovacs, L.: Effects of deep freezing on boar sperm. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 30: (4): 243-245 (1980).
 36. Iritani, A.: Problems of freezing spermatozoa of different species. Proc. 9th. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid, Spain. 1:115-131, 1980.
 37. Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willens, C.M.T. and J.M. Rademaker.: Fertility of boar semen stored in BL-1 and Kiev extenders at 18°C for three days. Proc. 6th. Cong. Int. Pig. Vet. Soc. Copenhagen. p. 33, 1980.
 38. Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willens, C.M.T. and W. Sybesma.: Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I: Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. J. Anim. Sci. 52: (5): 1130-1136 (1981).
 39. Johnson, L.A., Aalbers, J.G. and J.A.M. Arts.: Use of

boar spermatozoa for artificial insemination. II: Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in gilts inseminated either at fixed time or according to Walsmeta readings. J. Anim. Sci. 54: (1):126-131 (1982).

40. Johnson, L.A.: Fertility of boar semen frozen at differing sperm concentrations. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, 2:199-201, 1984.
41. Johnson, L.A.: Artificial insemination of swine: Fertility using several liquid semen diluents. Pig News and Information. 6:(1)54: (abstr.) (1985).
42. Jones, R.C.: Uses of artificial insemination. Nature 229: 534-537 (1981).
43. Kelly, R.W.: Effect of seminal prostaglandins on the metabolism of human spermatozoa. J. Reprod. Fert. 50: 217-222, (1977).
44. Kenneth, C. Herbst.: Artificial insemination. Proc. Am. Assoc. of Swine Prac. Cincinnati, 1:98, 1983.
45. König, I.: Inseminación de la cerda. Acribia. Zaragoza España, 1979.
46. Kononov, V.P. and Narizhnyl, V.: The technology of freezing boar semen. Pig News and Inf. 4:(1):70 (abstr) (1983).
47. Kozumplik, J.: The effect of different concentration of Oestrophan spofa (A synthetic analogue of prostaglandin F2 alpha) on the motility of boar spermatozoa in vitro

- Pig News and Inf. 6:33 (abstr.) (1983).
48. Larsson, K.: Fertility of deep frozen boar spermatozoa at various intervals between insemination and induced ovulation. Influence of boars and thawing diluents. Acta Vet. Scand. 17:63-73 (1976).
 49. Larsson, K. and Einarsson, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Influence of thawing diluents and of boars. Acta Vet. Scand. 17:43-62 (1976).
 50. Larsson, K. and S. Einarsson.: Influence of boars on the relationship between fertility and post-thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 17:74-82 (1976).
 51. Larsson, K., Einarsson, S. and L. Nicader. : Influence of thawing diluents on vitality, acrosome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 17:83-100 (1976).
 52. Martinat, B.F., Bariteau, F., Bussiere, J. and Terqui, M.: Field use of progestagen (Altrenogest) for estrus control in gilts. Influence of different system of management on fertility. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, 3:333-336, 1984.
 53. Maxwell, W.M.C. and S. Salamon.: Fertility of frozen-Thawed boar semen. Austr. J. Biol. Sci. 32:243-249. (1979).
 54. McDonald, L.E.: Reproducción y endocrinología veterinaria

rias. Interamericana. México, D.F., 1981.

55. Melrose, D.R. and C. O'hagan.: Investigation into techniques of insemination in the pig. Proc. 4th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. The Hague. 4: 855, 1985.
56. Memon, M.A., Gustafsson, B.K., Graham, E.F. and Crabo B. G.: Effects of prostaglandin supplementation on frozen ram spermatozoa. Proc. 10th. Int. Cong. Anim. Rep. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois 2:201-203, 1984.
57. Moore, H.D.M. and K.G. Hibbit .: Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. J. Reprod. Fert. 50:349-352 (1977)
58. Nagase, H. and T. Niwa.: Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. Proc. 5th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Trento. 3:410, 1964.
59. Nagai, T., Niwa, K. and A. Iritani.: Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 70:271-275 (1984)
60. Neter, John and William Wasserman.: Applied Linear Statistical Model. Richard D. Irwin Inc. Homewood, Illi. 1974.
61. Niwa, T., Hashizume, T., Togashi, M. and T. Konda.: Influence of addition of Prostaglandin F2 alpha to boar semen diluent upon viability of sperm, conception rate and achievement of piglets Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congr. México, D.F., 1982.

62. Niwa, T. and Hashizume, T.: Studies on the deep freeze storage of pelleted boar semen. V: Test of conception. Bulletin of the laboratory of Artif. Insem. Iwate University 3:24-30 (1982).
63. Odehal, F., Barth, T. and Jost, K.: Effect of oxytocin analogues MeDCOT-1 and DCOT-6 in liquid boar semen on conception rate and litter size. Pig New Inf. 4: (2): 165 (Abstr.) (1983).
64. Osinowo, O. and S. Salamon.: Examination of some processing methods for freezing boar semen. Austr. J. Biol. Sci. 29: 325-333 (1976).
65. Osinowo, O. and S. Salamon.: Fertility test of frozen boar semen. Austr. J. Biol. Sci. 29: 335-339 (1976).
66. Ostashke, F.I., Pavlenko, M.P. and Pavlenko, L.N.: Antishock effect of yolk and its components in cooling bull, ram and boar spermia. Proc. 10th. Int. Cong Anim. Repro. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois 2:209-211, 1984.
67. Pacová, J., Dupal, J. and Babusik, P.: Testing two different methods of freezing boar semen and laboratory results. Conception rate and fertility of sows. Pig News and Inf. 4: (2); 171 (abstr.) (1983).
68. Polge, C., Salamon, S. and Wilmut I.: Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. Vet. Rec. 87: 424-428 (1970).
69. Polge, C.: Fertilization in the pig and horse. J. Repr. Fert. 54: 461-470 (1978).
70. Pope, W.F. and First, N.L.: Factors affecting survival

- of pig embryos. Theriogenology. 23: (1) 91-105 (1985).
71. Potter, W.L., Upton, P.C. and B.L. Dunn.: Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome boar spermatozoa subjected to deep freezing. Austr. J. Biol. Sci. 32: 575-579 (1979).
 72. Premll, B., Herak, M., Pavvna, H. and Sič, R.: Evaluating deep frozen boar semen with regard to changes in the acrosome. Pig News and Inf. 4: (2): 162 (abstr.) (1983).
 73. Pursel, V.G. and Johnson, L.A.: Fertility with frozen boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 33: 265 (abstr.) (1971).
 74. Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Rampacek, G.B.: Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci. 34: (2) 278-283 (1972).
 75. Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L.: Acrosome morphology of boar spermatozoa during in vitro aging. J. Anim. Sci. 38: (1) : 113-116 (1974).
 76. Pursel, V.G. and Johnson, L.A.: Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology. I: (2): 63-68 (1974).
 77. Pursel, V.G. and Johnson, L.A.: Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci. 40: (1): 65, 67, (1975).
 78. Pursel, V.G. Schuman, L.L. and Johnson, L.A.: Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. Biol. Reprod. 19: 69-76 (1978).

79. Pursel, V.G., Schuman, L.L. and Johnson, L.A.: Effect of Orvus es Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm. J. Anim. Sci. 47: (1): 198-201 (1978).
80. Pursel, V.G.: Advances in preservation of swine spermatozoa. Beltsville Symp. Agr. Res. New, Jersey, p. 145.157, 1979.
81. Pursel, V.G., Elliot, D.O. and Newman, C.W.: Mating by vasectomized boars failed to improve fertility in gilts inseminated with frozen semen. Theriogenology. 18: (1): 61-64, (1982).
82. Qui, I., Qui, L. and Wang, Z.: A freezing technique for boar semen. Acta Vet.Zoot. 13: (2): 101-106, (1982).
83. Rillo, S.M., Alias, E.Díaz, C.Y. y C. Pérez, M.: Congelación de semen de verraco. Proc. 9th. Int. Congr. Anim. Re prod. Artif. Insem. Madrid, Spain, 3: 398, (abstr.), 1980.
84. Rillo, S.M., Vazquez, I. y E. Alias.: Recuperación de la motilidad espermática y su relación con acrosomias en el semen de verraco conservado y congelado. Proc. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid, Spain, 3:403 (abstr.), 1980.
85. Rillo, S.M., Vazquez, I., Alias E. y C. Díaz, Y.: Importancia de la presión ósmotica del diluyente de descongelación del semen porcino. Proc. 9th. Int. Cong. Anim. Re prod. Artif. Insem. Madrid, Spain. 3: 406, 1980.
86. Rillo, S.M.: Reproducción e inseminación artificial porcina. Aedos. Barcelona, España. 1982.

87. Salamon, S.: Deep Freezing of boar semen. III: Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume and method of thawing on survival of spermatozoa Austr. J. Biol. Sci. 26: 239-247 (1973).
88. Salamon, S., Wilmut, I. and C. Polge.: Deep freezing of boar semen. I: Effects of diluents composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. Austr. J. Biol. Sci. 26: 217-220 (1973).
89. Sammelwitz, P.H., Driek, P.J. and Nalbandov, A.V.: Effects of progesterone on embryo mortality of rats and swine. J. Anim. Sci. 15:1211 (abstr.) (1957).
90. Scheid, L.R., Westendorf, P. and H. Treu.: Deep freezing of boarsemen in plastic-tubes ("Hulsenberg-Pailleten"): Effect of diferent glycerol concentrations. Proc. 6th Int. Pig. Vet. Soc. Congr. Copenhagen. Pag. 28. 1980.
91. Scheid, I.R.: Tiefgefrieikonservierung von ebersamen in kunststoffrohre. Erprobung der Gefrierschutzsubstanzen glycerin, Dimethylsulfoxyd und Acetamid. Tierärztliche Hochschule Hannover. Hannover, 1980.
92. Schilling, E., Vengus, M. and D. Smidt.: Prediction of the quality of boar spermatozoa after freezing and long storage. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemem. Urbana-Champaign. Illinois, 2: 64, 1984.
93. Senegacnik, J., Vengus, M. and G. Bajt.: The influence of some freezing and thawing buffers on vitality of thawed boar spermatozoa. Proc. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid, Spain.: 405, 1980.
94. Snedecor, G. W. and W. G. Cochram.: Statistical methods.

- 6th. Edition. The Iowa State University Press. Ames, Iowa, 1979.
95. Sorensen, Jr. A.M.: Reproducción animal: Principios y prácticas. McGraw Hill. México, D.F. 1982.
96. Spies, H.G., Zimmerman, D.R., Self, H.L. and Casida, L. E.: The effect of exogenous progesterone on formation and maintenance of the corpora lutea and on early embryo survival in pregnant swine. J. Anim. Sci. 18: 163-172 (1959).
97. Stanchev, P.H., Kunavongkrit, A., Edqvist, L.E. and H. Eriksson.: Receptors of androgens and progesterone in the porcine cervix. Theriogenology. 21: (5) 757-765 (1985).
98. Strzezek, J., Glowaki, J., Magiessaka, E., Lubarda, Z. and Jablonawaska, Cz.: Some Aspects of cryobiochemistry of boar semen. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Repr. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois, 3:244-247, 1984.
99. Torbjørn, A. and S.E Stavne.: Experience with deep-frozen boar semen. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois 2: 181-182, 1984.
100. Van de Wiel, D.F.M.: Evaluation of pregnancy status. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana Champaign, Illinois, 4: 26-33, 1984.
101. Viring, S.: Distribution of spermatozoa live and dead in the reproductive tract of jilts at different times after artificial insemination. Acta Vet. Scand. 21: 587-597 (-1980).
102. Vivanco, W.yC. Vergara.: Congelación de semen de verraco.

- Proc. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid, Spain.
3:397, 1980.
103. Wayne, W. Daniel.: Bioestadística. Limusa. México, D.F. 1983.
104. Webel, S.K., Reimes, I.J. and Dziuk, P.J.: The lack of relationship between plasma progesterone levels and the number of embryos and their survival in the pig. Biol. Reprod 13:177-182 (1975).
105. Webel, S.A., Schel, J.P. and J.C. Bouffaultz.: Estrus control in pigs: U.S.A. field trial results with a new Progestin compound RU-2267-Regumate. J. Anim. Sc. 42:1358-1365 (1976).
106. Webel, S.K.: Ovulation control in the pig. In. Control of ovulation. Edited by Crighton, D.B., Haynes, N.B., Foxcroft, G.R. and Lamming G.E., 421-434, Butterworths, London, 1978.
107. Wildt, D.W., Culvert, A.A., Morcon, C.B., and Dukelow W.R.: Effect of administration of progesterone and estrogen on litter size in pigs. J. Reprod. Fert. 48: 209-211, (1976).
108. Wilmut, I., Salamon, S. and C. Polge.: Deep freezing of boar semen. II. Effects of method of dilution, glycerol concentration and time of semen glycerol contact on survival of spermatozoa. Austr. J. Biol. Sci. 26: 231-237 (1973).