

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

HISTORIA Y DESARROLLO DE LA
INSEMINACION ARTIFICIAL EN EL
GANADO BOVINO DE EL SALVADOR

USO DEL DILUYENTE C.M.E. (COCONUT MILK EXTENDER)

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TITULO DE
DOCTOR EN QUIMICA Y FARMACIA

POR

RAQUEL ALICIA ZELAYA CHORRO

SAN SALVADOR

OCTUBRE DE 1970.



636 0524
249h
1970
I.C.C.G.
E.L.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Dr. José María Méndez.

Secretario

Dr. Oscar Quinteros Orellana.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Decano

Dr. Julio César Morán Ramírez.

Secretario

Dr. Elías Alvarado Cornejo.

10 / 12 - 71 / 30 #37455

DEDICATORIA :

A mis queridos padres.

A mis hermanos.

A mis amigos y compañeros.



Primer Examen General de Doctoramiento

Dra. Guadalupe Ventura de Calles

Dra. Rosa María Portillo de Rivas

Dra. Rosa Hernández de Díaz

Segundo Examen General de Doctoramiento

Dra. Betty Murcia Peralta

Dr. Víctor Ortíz

Dr. Julio César Morán Ramírez

Jurado Calificador de Tesis

Lic. Manuel Humberto Machón

Lic. José Jaime Lozano

Dr. Pedro José Rosales.

I N D I C E

INSEMINACION ARTIFICIAL - HISTORIA	1
a) Concepto.	
b) Historia.	
ANATOMIA Y FISIOLOGIA GENITAL DEL TORO Y LA VACA .	5
a) Aparato genital femenino.	
b) Ciclo estral de la vaca.	
c) Aparato genital masculino.	
d) Formación del semen.	
RECOLECCION DEL SEMEN	14
a) Uso de la vagina artificial.	
b) Uso del electro-eyaculador.	
ANALISIS DEL SEMEN	17
a) Volumen.	
b) Densidad.	
c) Motilidad.	
d) Diferenciación de vivos y muertos.	
e) Formas anormales.	
f) Calificación del semen por % de espermatozoides vivos y motilidad.	
DILUCION DEL SEMEN	25
a) Diversos diluyentes usados y su preparación.	
b) Semen congelado.	
c) C M E.	

INSEMINACION DE LA VACA Y FECUNDACION	35
a) Inseminación.	
1) Método del espejulo.	
2) Método recto-vaginal.	
b) Fecundación.	
REGISTROS	39
RESULTADOS	43
BIBLIOGRAFIA	51

INSEMINACION ARTIFICIAL - HISTORIA

La Inseminación Artificial consiste en introducir de una manera mecánica el germen reproductor del macho en el aparato genital de la hembra, en la época propicia del celo. De esta manera dicho método creado por la mente del hombre, se ha convertido en el mejor método para mejorar el genotipo y fenotipo de la descendencia en el ganado bovino.

Historia.

La Inseminación Artificial en el país se inició el año de 1952, bajo la dirección de técnicos nacionales que con el asesoramiento de técnicos extranjeros contratados por el Gobierno, formaron el programa de Inseminación Artificial. Se empezó por entrenar personal adecuado que luego se organizó en un sistema de rutas que cada uno recorría en motocicletas previamente equipadas, efectuando las inseminaciones que se les presentaban. La inseminación se efectuaba con el sistema de espéculo o método Italiano y se usaba para diluir el semen un diluyente refrigerado a base de Yema de huevo, Citrato de Sodio y Antibióticos. La recolección del semen se hacía tres veces por semana,

La falta de tecnicismo en la Ganadería Nacional, las limitaciones que presentaba este sistema de rutas, y las dificultades con que tropieza toda reforma redundó, en que el programa no tuviera el éxito esperado. Se siguió trabajando en esta forma hasta el año de 1955 que se introdujo el sistema de recto-vaginal para efectuar la inseminación, quedando así abandonado el uso del espéculo. La aceptación del programa fue avanzado en forma muy lenta hasta el año de 1965; año en el cual se cambió radicalmente el funcionamiento del programa con la llegada al país del Dr. Charles Norman, Biólogo, de la Universidad de West-Virginia U. S. A., enviado por la Agencia de Desarrollo Internacional (A I D), como una colaboración al programa de reproducción. El Dr. Norman, introdujo el CME (Cocunut Milk Extender) (7), para la dilución del semen, abandonando el uso del semen refrigerado. La introducción de este nuevo diluyente, que no necesita refrigeración y la escuela de Inseminación para la preparación de técnicos inseminadores que trabajan en las haciendas en forma particular, fue principalmente lo que hizo que el programa tomara un gran auge, el programa se planificó de una manera mejor y se dió asistencia veterinaria a aquellos ganaderos que carecían de ella, la supervisión aumentó y se introdujeron nuevos y mejores métodos de supervisión y de registro, se crearon los bancos de semen para toda la República, o sea depósitos donde los ganaderos se abastecen del semen enviado por la Sección dos veces por semana.

Situación Actual.

En la actualidad la Sección de Inseminación Artificial tiene como objetivos básicos:

- 1o. Contribuir al mejoramiento genético del hato nacional mediante la producción y suministro de semen de toros de alta calidad.
- 2o. Velar por el buen uso del semen producido.
- 3o. Preparar Inseminadores privados, capacitándolos para prestar sus servicios a los Ganaderos del país.

Para el cumplimiento de éstos objetivos, la Sección desarrolla los programas siguientes:

- 1o. Programa de producción de dosis de semen.
- 2o. Programa de distribución y supervisión.
- 3o. Programa de escuela de inseminadores, (6).

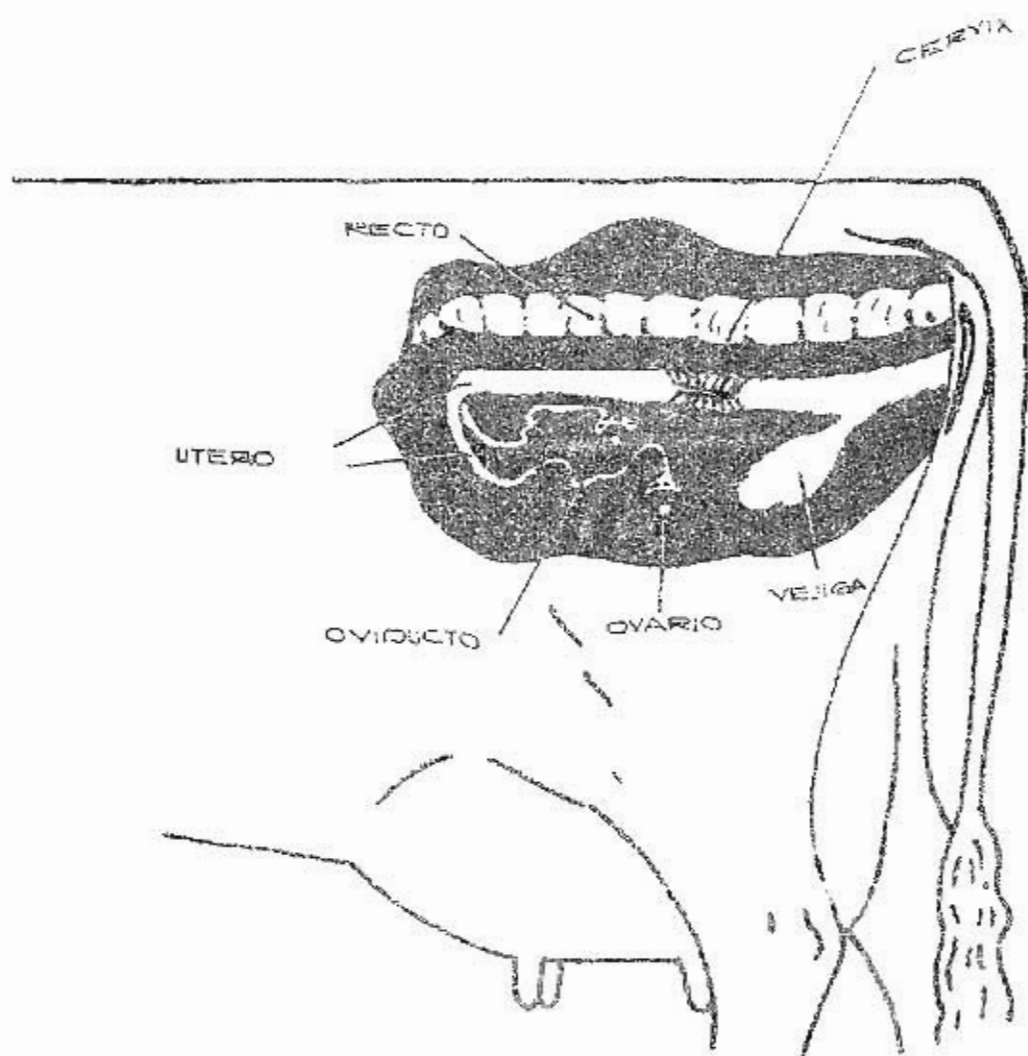
CUADRO DEMOSTRATIVO DE LABORES DE LA SECCION DE INSEMINACION

ARTIFICIAL EN EL PERIODO DE 1965 - 1969 (6).

Año	Viales Produ- cidos	Insemina- ciones	Palpa- ciones	Cursos Impar- tidos	Inseminadores		Distribución del semen		No. Usuarios		Toros en servicio
					Egre- sados	Traba- jando	Depó- sitos	Ban- cos	Propie- tarios	Hacien- das	
1965	22.000	6.000	-	4	71	100	-	15	100	80	9
1966	50.000	15.000	1.640	9	158	200	-	17	150	100	12
1967	70.000	24.000	3.626	10	115	250	-	18	220	119	12
1968	73.000	21.000	4.000	14	134	203	24	22	300	144	14
1969	66.336	20.000	7.684	6	78	158	29	26	136	152	14

ANATOMIA Y FISIOLOGIA GENITAL DEL TORO Y LA VACA

a) Aparato genital femenino.



b) Ciclo estral de la vaca.

La vida reproductora del ganado vacuno, como la de otros animales, está caracterizada por una serie de ciclos (1). Estos ciclos se inician en la pubertad o madurez sexual. El ciclo estral (o sexual) se completa en las vacas cada 21 días aproximadamente. Como en todas las actividades biológicas, hay notable variación entre los individuos. La gestación desde luego, interrumpe el ciclo.

En la hembra madura sexualmente y no preñada, hay un período de preparación para la cubrición y ovulación (desprendimiento del óvulo). Durante este período se incrementa la ---- afluencia de sangre al revestimiento del útero. El folículo y el óvulo están madurando. La secreción de estrógeno desde el folículo a la sangre, hace que la vaca acepte la monta por el macho. En este momento la hembra está en celo. El período álgido del celo dura normalmente de 12 a 18 horas. Como el óvulo se desprende aproximadamente doce horas después del final del período álgido del celo y como el espermatozoide tiene una vida de duración limitada en el aparato reproductor de la hembra, debe tener lugar la cubrición durante la segunda mitad del período de celo. Después de la ovulación se forma el cuerpo lúteo o cuerpo amarillo, en el lugar donde se rompió el folículo. La hormona Progesterona que se encuentra en esta estructura, ayuda

a preparar el útero para el sostenimiento del embrión en crecimiento. El cuerpo lúteo es esencial para el sostenimiento de la gestación.

El proceso de un ciclo normal sexual, es una actividad sumamente compleja que no se conoce de un modo completo. Además de las hormonas del ovario, intervienen las de la glándula pituitaria, las adrenales y la placenta. La interacción de estas hormonas es probablemente tan importante como las cantidades absolutas que se presenten.

Se cree que la hormona estimulante del folículo formada en la glándula pituitaria determina el desarrollo del folículo. Cuando el estrógeno del folículo está en cantidad relativamente elevada en la corriente sanguínea, reduce la producción de hormona estimulante del folículo por la pituitaria, liberando una sustancia que determina la rotura del folículo.

La hormona luteinizante, también de la pituitaria, es responsable de la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Las hormonas de la placenta desempeñan un cierto papel aquí, pues si la fecundación e implantación no tiene lugar, el cuerpo lúteo empieza a retraerse después de un corto período. El útero vuelve a su estado de reposo y el ciclo se repite.

La comprobación del celo en las vacas requiere una observación cuidadosa y alguna experiencia. Se deben llevar registros exactos de todas las hembras en celo, para establecer su ciclo productor y llevar a cabo la cubrición en el momento conveniente.

Las vacas que hayan parido deben cubrirse como regla general en el período de celo que se presenta 60 días después -- del parto. Se necesita tiempo para que cedan la inflamación y la congestión y para que se recupere el tono muscular normal.- La fecundación puede tener lugar antes de que transcurran 60 - días después del parto, pero se pierde un número sumamente --- grande de embriones, por falta de una implantación adecuada en estas fecundaciones prematuras.

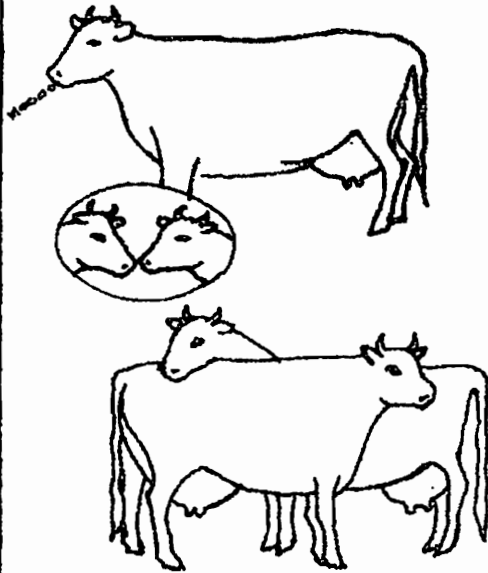
Las vacas que se hayan inseminado y que no presenten síntomas de celo pasados 40 días, deben ser sometidas a un diagnóstico de preñez, por palpación rectal, la cual nos puede proporcionar conocimientos seguros de que la vaca está en gestación por la presencia del feto en el útero y otros síntomas como son líquidos fetales, abultamiento mayor del cuerno gestante y la presencia del cuerpo lúteo de gestación(1).

CICLO DE CELO EN LA VACA

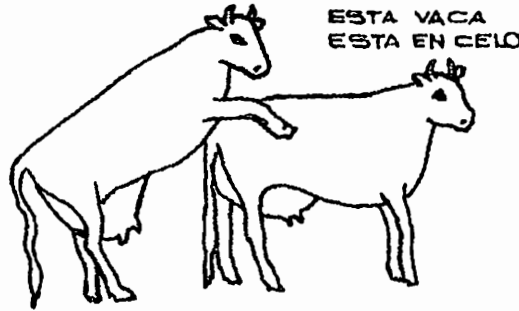
INICIACION DEL CELO 8 hrs.

PERIODO ALGIDO DEL CELO 18 hrs.

TERMINACION DEL CELO



- 1 - ESTA QUIETA Y MUGE
- 2 - HUELE A OTRAS VACAS
- 3 - INTENTA MONTAR A OTRAS VACAS, PERO NO SE DEJA MONTAR
- 4 - VULVA HUMEDA, ROJA Y LIBERAMENTE INFLAMADA.
- 5 - PUEDE HABER UN DERRAME DE MUCOSIDAD CLARA DE LA VULVA



- 1 - NO SE DEJA MONTAR PERO INTENTA MONTAR
- 2 - HUELE A OTRAS VACAS
- 3 - PUEDE DERRAMAR UNA MUCOSIDAD CLARA POR LA VULVA

POR CIENTO DE CONCEPCIONES

100
80
60
40
20

- 1 - SE DEJA MONTAR
- 2 - MUGE CON FRECUENCIA
- 3 - ESTA NERVIOSA Y EXCITADA
- 4 - MONTA A OTRAS VACAS

DEMASIADO PRONTO

ESTE ES EL MOMENTO DE CUBRIR

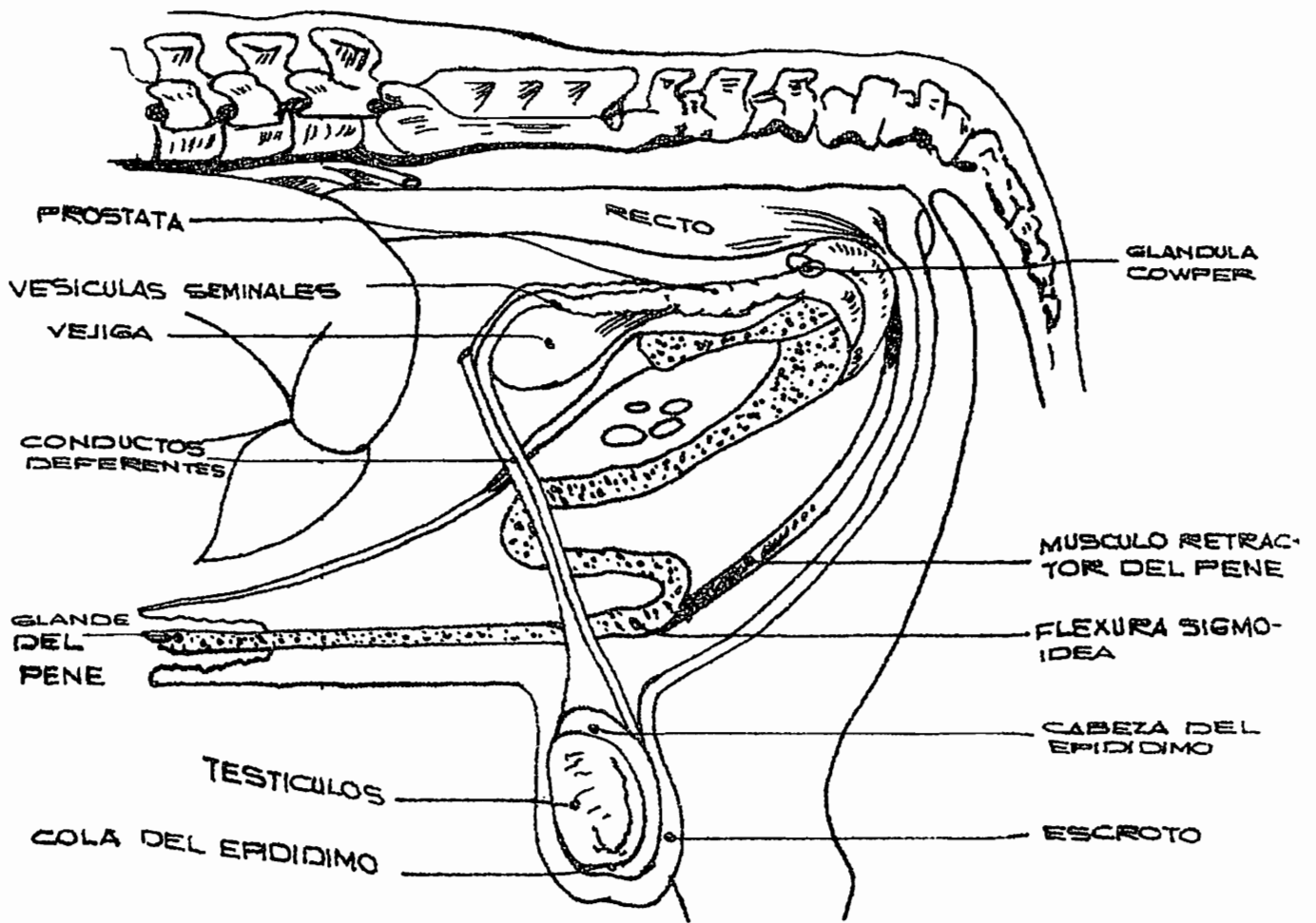
ACEPTABLE

DEMASIADO TARDE

0 4 8 12 16 18 22 26 30

HORAS DESDE EL PRINCIPIO DEL PERIODO ALGIDO DEL CELO

b) Aparato genital masculino.



Un aparato genital, apto para la fecundación artificial en bovinos debe corresponder a un toro en magníficas condiciones; por lo tanto todo toro que ingresa al Servicio de Inseminación Artificial, ha sido sujeto a los exámenes correspondientes de salud que certifican que está libre de las principales enfermedades infecto-contagiosas como son: La Brucelosis, Tuberculosis, Tricomoniiasis, Vibriosis, Leptospirosis. Además debe ser un toro de raza pura, registrado y con una historia genética -- (Pedigree) que asegura dentro de las posibilidades razonables -- engendrar crías de alta producción en carne y leche como objetivos principales.

d) Formación del Semen.

Dentro de los testículos, los espermatozoides, (4) se producen en millares de túbulos microscópicos (Tubos seminíferos) que se conectan a túbulos más grandes hacia el centro del testículo. Las células que cubren la parte interna de los pequeños túbulos se dividen en dos para formar espermatozoides inmaduros que, en alguna forma se impelen a través de la longitud de túbulos más grandes localizados al centro de cada uno de los testículos. Los túbulos más grandes dejan al testículo cerca de su parte más elevada y llegan a la cabeza del Epidídimo que consiste en un tubo muy enrollado que mide varios pies de lar-

go. El esperma se haya almacenado dentro del epidídimo durante unas cuantas semanas, tiempo durante el cual se madura. Al final del epidídimo se haya el esperma disponible para la eyaculación. Se requieren desde que el esperma empieza su formación - en los testículos hasta que se haya disponible para la eyaculación al final del epidídimo 7 u 8 semanas. Consecuentemente si un toro es infértil hoy, tendremos que averiguar la causa de la infertilidad desde dos o tres meses atrás.

La cola del epidídimo se une al conducto deferente el cual es un canal que mide de 2 a 3 pies de largo, este transporta el esperma hasta la base del pene cercano a la vejiga urinaria.

En el epidídimo y conducto deferente los espermatozoides están inmóviles conservando su energía hasta el momento de la eyaculación. Contracciones musculares con duración de fracciones de segundo del conducto deferente y del epidídimo propulsan el semen a la uretra dentro del pene. Al mismo instante, - contracciones de glándulas secundarias fuerzan su contenido flúido dentro de la uretra. El resultado combinado de los espermatozoides con el flúido colectado, es lo que se llama semen, que propulsado instantaneamente a través del pene sale hasta el exterior.

Los espermatozoides forman solo un 20 % del volumen total del semen. El Resto de la eyaculación proviene de las glándulas sexuales secundarias localizadas a lo largo del tracto reproductor del toro, el cual es muy rico en Fructuosa, un azúcar que sirve como un nutriente muy importante para los espermatozoides (4).

RECOLECCION DEL SEMEN

Se debe tomar en cuenta edad, raza, condición física, alimentación, cuidado y manejo e intervalos en las recolecciones para el apetito sexual del animal y para una mayor calidad, fertilidad y viabilidad del semen recolectado.

a) Vagina Artificial.

El fundamento de este método, (3) consiste en proporcionar un medio semejante al de la vagina natural, para la eyaculación del semen.

Para su uso, se estimula al toro a que monte a una vaca o un animal pasivo de modo normal. El operador desvía el pene hacia la vagina artificial, en la que se recoge la eyaculación en un tubo de ensayo. Los toros muestran una gran variación individual en su comportamiento. El establecer las características de cada animal requiere una gran habilidad, práctica y experiencia de parte del que efectúa la recolección. A cada toro habrá que conocerle la temperatura a la cual eyacula, el ambiente y la hora que se muestra más apto, como el señuelo que prefiere, etc.

La vagina artificial está compuesta de un cilindro ex

terior de caucho endurecido provisto de una abertura que lleva un tornillo o tapón de cierre para la introducción y evacuación del agua (1).

Un cilindro de goma delgada y flexible se introduce en el cilindro de caucho, revistiendo sus dos extremos. La cavidad cerrada que queda limitada por estos dos cilindros forma una cámara circular que solo se comunica con el exterior a través del orificio que existe en la pared del cilindro externo. Uno de los extremos de la vagina artificial permanece abierto, mientras que en el otro se adapta un cono de goma, que a su vez se ajusta a un tubo colector graduado de vidrio en que se recoge el semen.

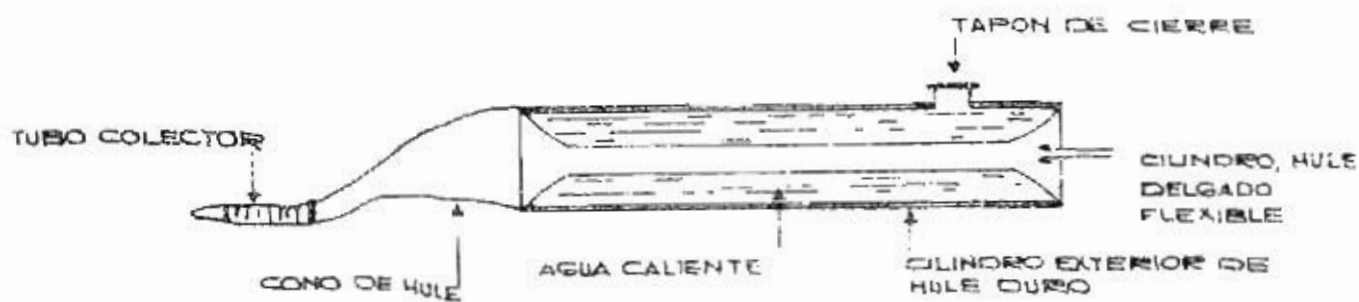
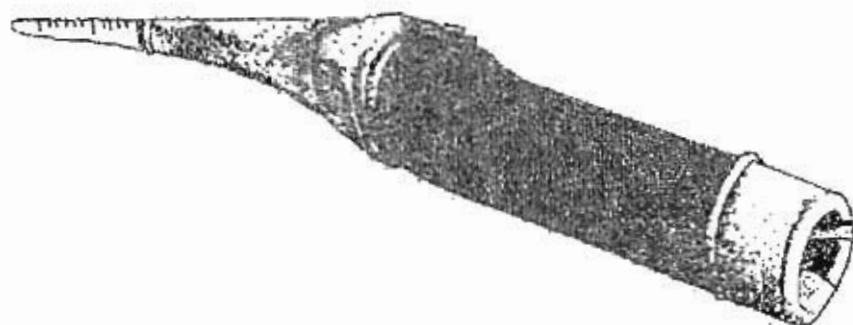
Para su empleo, la cámara circular se llena con agua caliente, aproximadamente 41°C . en cantidad para crear una presión y una temperatura semejante a la que existe en la vagina natural. Antes de la recolección se debe lubricar la parte interior de la vagina (3).

b) Electroeyaculador.

El electroeyaculador se emplea para obtener semen de toros viejos o de los que no pueden realizar la monta, por ha-

ber sufrido algún daño físico. Este aparato consta de un electrodo que se coloca en la cavidad rectal, muy cerca del aparato reproductor y de los nervios que actúan sobre él. Una serie de impulsos eléctricos estimulan la eyaculación del semen, que es recogido en un recipiente graduado (10).

Los toros responden individualmente a la estimulación por lo cual es imposible recomendar un procedimiento estandar. Cantidad de corriente, frecuencia de ciclos y el ritmo de la estimulación deben ser ajustados de acuerdo a la resistencia del toro. Es obvio que los resultados dependen en gran parte de la experiencia del operador. La erección generalmente se obtiene entre los 20 y 25 ciclos de frecuencia y entre 2 y 5 voltios. Frecuencias entre 25 a 30 y un voltaje de 3 a 10 voltios son generalmente suficientes para obtener la eyaculación. La estimulación es dada intermitentemente con intervalos de $1/4$ a $3/4$ de minuto (10).



CORTE LONGITUDINAL

VAGINA ARTIFICIAL

ANÁLISIS DEL SEMEN

El trabajo sobre la contrastación del semen de toro, consiste en las distintas pruebas rápidas empleadas para determinar con exactitud la calidad de una muestra de semen, en función de la fertilidad y capacidad de supervivencia del semen bajo diferentes condiciones.

a) Volumen.

El volumen varía entre 3-15 cc. con un promedio de 7 cc. por eyaculado. Los volúmenes obtenidos por electroeyaculación, (10), no reflejan la capacidad del toro, dependen de la duración y de la estimulación.

b) Densidad.

El aspecto del eyaculado, consistencia y color del semen es originado por un mayor o menor abundancia de espermatozoides en el líquido seminal. La consistencia será cremosa o flúida; el color varía del blanco al blanco amarillento, estimando la concentración de células espermáticas (10). Para determinar la concentración de espermatozoides por unidad de volumen, se usan el Hematocímetro y el Fotocolorímetro.

La densidad es individual en cada toro y también en cada eyaculación. Una baja concentración en la primera eyaculación, se debe generalmente a una inadecuada preparación del toro antes de la recolección.

Muestras obtenidas por electroeyaculación, (10) son más bajas en concentración que las obtenidas por medio de la vagina artificial (3).

Uso del Hematocímetro para la Concentración o número de Espermatozoides.

- 1o. Pipetear esperma hasta la división 0.5.
- 2o. Aspirar solución acuosa de Eosina o Cloruro de Sodio al 3 % hasta división 101.
- 3o. Agitar.
- 4o. Expulsar unas 3 gotas.
- 5o. Cargar por capilaridad la cámara. Dejar en reposo de 3 a 5 minutos para sedimentación.
- 6o. Hacer el recuento al microscopio. Se contarán -- las cabezas de la misma manera que se hace para el recuento de glóbulos rojos en la sangre.
- 7o. Al resultado obtenido agregarle 7 ceros (7).

Lectura del Fotocolorímetro y Número de Espermatozoides.

Diluir 1/10 cc. de semen puro en 30 cc. de solución
de Citrato de Sodio al 2.9 %.

Lectura del Fo- tocolo- rímetro	Espermat. cc.	millones	Lectura del Fo- tocolo- rímetro	Espermat. cc.	millones	Lectura del Fo- tocolo- rímetro	Espermat. cc.	millones
5	4431		40	1154		75	164	
6	4144		41	1115		76	143	
7	3901		42	1078		77	122	
8	3696		43	1040		78	102	
9	3505		44	1004		79	82	
10	3339		45	969		80	62	
11	3189		46	934		81	42	
12	3051		47	900		82	23	
13	2926		48	867		83	4	
14	2809		49	834				
15	2700		50	803				
16	2598		51	771				
17	2503		52	741				
18	2413		<u>53</u>	<u>711</u>				
19	2327		54	681				
20	2247		55	652				
21	2170		56	624				
22	2096		57	596				
23	2026		58	569				
24	1959		59	542				
25	1895		60	515				
26	1833		61	489				
27	1774		62	464				
28	1716		63	439				
29	1661		64	414				
30	1608		65	389				
31	1556		66	365				
32	1506		67	341				
33	1457		68	318				
34	1410		69	295				
35	1365		70	272				
36	1320		71	250				
37	1277		72	228				
38	1235		73	206				
39	1194		74	185				

c) Motilidad.

La motilidad o movilidad en masa se estima por la formación de un oleaje más o menos vigoroso, tanto en el centro como en los márgenes de la gota de semen vista al microscopio.

Una motilidad vigorosa refleja la concentración y viabilidad de las células espermáticas.

La motilidad progresiva, es la que garantiza mayores probabilidades de la fertilidad del semen puesto que se considera que los espermatozoides avanzan en líneas rectas, movimientos rotarios, circulares y oscilatorios no son tomados en cuenta. En la observación de la motilidad se incluye el movimiento de los espermatozoides que flotan en el plasma seminal y que son arrastrados por la corriente originada por el flagelo de las células espermáticas vivas.

d) Diferenciación de vivos y muertos.

La cuenta espermática para determinar el porcentaje de vivos y muertos se efectúa mediante la preparación de frotis teñido con Eosina, Nigrosina (soluciones al 5 y 10 %). - Este método se basa en la propiedad que tiene la Eosina de pe

netrar y colorear el esperma muerto; el esperma vivo repele esta coloración (10).

e) Formas Anormales.

Un cálculo completo de anormalidades nos indica el porcentaje de células espermáticas incapaces para la fecundación; pudiendo estar relacionadas con trastornos de la espermatogénesis o manipulaciones del semen. Las anormalidades en la cabeza del esperma por lo general son el resultado de deficiencias funcionales en los testículos; las anormalidades en la cola, por la deficiencia de las glándulas secundarias (8).

Técnica para el Recuento de Formas Anormales.

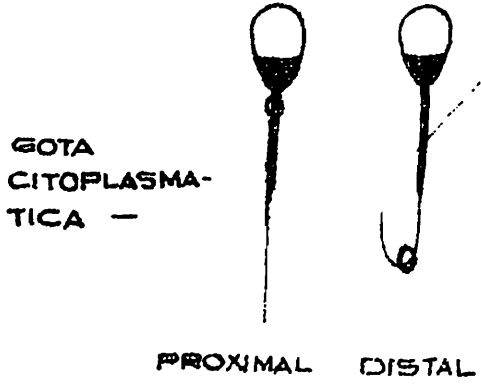
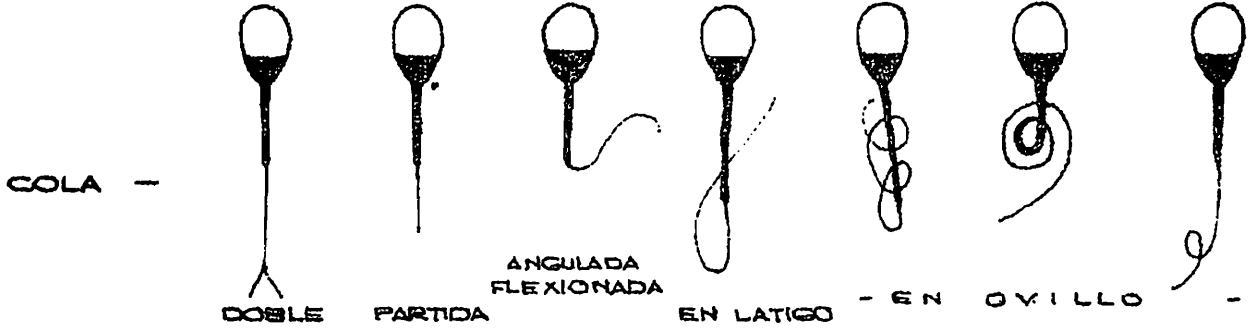
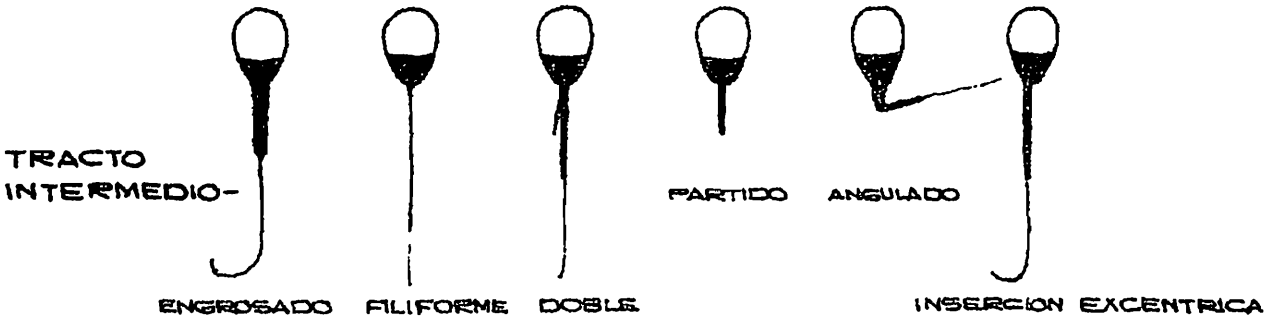
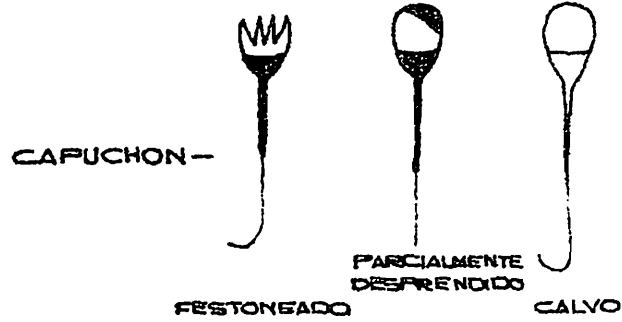
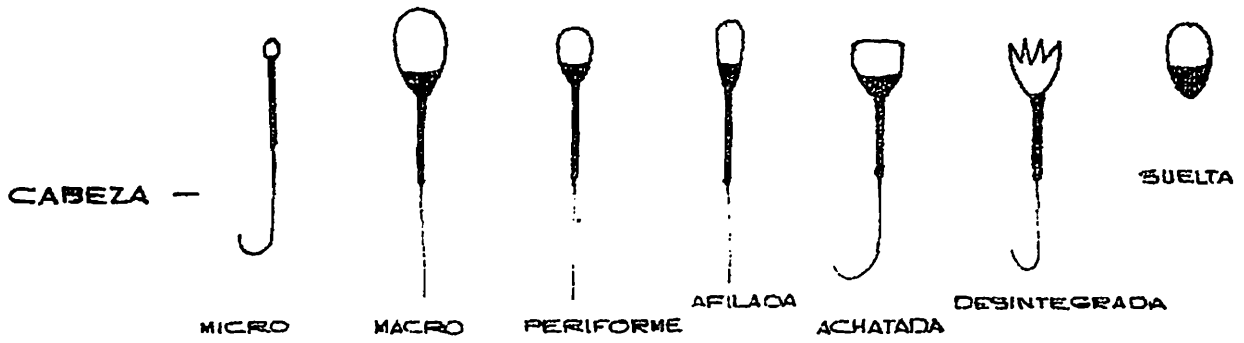
- 1o. Hacer un frotis de semen diluido en solución salina.
- 2o. Agregar una solución al 5 % de Cloramina T. Dejar 30 segundos, luego lavar.
- 3o. Añadir fijador de Suza. Dejar 5 minutos, lavar.
- 4o. Luego agregar solución de Acido Fosfomolibdico al 2 %. Dejar 3 minutos, lavar.
- 5o. Dejar por 5 minutos una solución de Cristal Violeta, lavar, secar y ver al microscopio (8).

El porcentaje de espermatozoides anormales no debe ser mayor del 10 %.

Fijador de Suza.

Sublimado corrosivo	4.5 gr.
Cloruro de sodio	0.5 gr.
Acido tricloroacético	2.0 gr.
Formalina	20.0 gr.
Acido acético glacial	4.0 gr.
Agua destilada	80.0 cc. (8).

FORMAS ANORMALES DE LOS ESPERMATOZOIDES



Calificación del semen por % de espermatozoides Vivos y Moti-
lidad.

Por % Espermatozoides Vivos.

5	90 %	espermatozoides	vivos	o	más
4	80 %	"	"	"	"
3	70 %	"	"	"	"
2	60 %	"	"	"	"
1	50 %	"	"	"	"
0	menos del 50 % de espermatozoides vivos.				

Por Motilidad.

5	Motilidad	progresiva	y	rapidez	general
4	Motilidad	progresiva	y	rapidez	general en un 70 % o más de los espermatozoides
3	Motilidad	progresiva	y	rapidez	general en menos - del 70 % de los espermatozoides pero más del 50 %.
2	Motilidad	progresiva	y	rapidez	general en menos - del 50 % de los espermatozoides.
1	Con algunos progresivos.				
0	Nada progresivos o muertos.				

DILUCION DEL SEMEN

La dilución del semen tiene por objeto aumentar el volumen total de la masa espermática con el fin de poder, a partir de una sola eyaculación, inseminar el mayor número posible de hembras y crear por otra parte, un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides.

Calidades que deben tener los medios de dilución: Presión osmótica, que será en lo posible isotónica con el esperma. El pH, que debe ser favorable para la conservación de la vitalidad espermática, sustancias tampones que deben proteger el esperma contra las variaciones del pH y los electrolitos y no -- electrolitos o sea cationes o aniones carentes de toxicidad -- (2).

La dilución del semen debe hacerse a una misma temperatura (semen y diluyente). Temperatura óptica 28-30°C.

a) Diversos Diluyentes Usados y su Preparación.

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

Los productos usados para este fin deberán ser químicamente puros y disueltos en agua destilada, a ser posible, -- agua bidestilada.

La yema de huevos parece tener una acción protectora y un efecto conservador sobre los espermatozoides permitiendo una mayor supervivencia de los mismos. Los lípidos del huevo se comportan como factores de protección pero no como factores de conservación, mientras que los complejos lípidos-proteicos gozan de estas dos propiedades.

El Citrato de Sodio como un sistema tampón que estabiliza la reacción del medio e impide una acidificación demasiado rápida.

La adición de Sulfamidas y Antibióticos inhibe el desarrollo de las bacterias que el semen contiene al momento de la recolección las cuales participan en forma desfavorable para su conservación, además ciertos gérmenes son agentes productores de abortos o simplemente de infecciones genitales más o menos graves. Las Sulfamidas y la Penicilina disminuyen notablemente el consumo de Glucosa por el esperma; esto puede ser debido a la detención del crecimiento bacteriano. La adición de Estreptomocina en los diluyentes aumenta el grado de fecundidad para el esperma de toros de escaso poder fecundante. Es

ta práctica, no excluye, sino al contrario aumenta la necesidad de practicar la recolección del esperma en las mejores condiciones higiénicas, con el fin de reducir al mínimo el grado de contaminación (2).

Diluyente a Base de Leche.

La leche que, como líquido espermático, contiene Fosfatos, Citratos y Azúcares es usada para la dilución del semen en estado natural, descremada o pasteurizada. La leche que ha de ser utilizada, se hierve durante algunos minutos transformando la Lactosa en Glucosa y Galactosa que favorecen la actividad --energética de los espermatozoides, además la ebullición destruye la Lactenina, sustancia tóxica para los espermatozoides, contenida en la leche. El uso de leche descremada presenta la ventaja de evitar la presencia de pequeñas gotitas de grasa, que dificultan la observación y que además limitan su movimiento. La adición de antibióticos en la leche permiten una mejor conservación (2 y 9).

Diluyente Yema de Huevo - Citrato de Sodio (Willet - Salisbury)

Este diluyente es el que se utiliza con más frecuencia

para la preparación del semen refrigerado. Se prepara con igual volumen de yema de huevo fresco y solución estéril de Citrato de sodio cristalizado al 2.9 %. El pH debe ser 6.7 a 6.8 (9).

a) Semen Congelado.

La congelación del semen es usada para prolongar por tiempo indefinido la capacidad fecundante del espermatozoide. Este método consiste en reducir las reacciones metabólicas del semen por medio de la congelación con Nitrógeno líquido o hielo seco juntamente con glicerol para contrarrestar los efectos nocivos de la congelación. Las temperaturas del Nitrógeno líquido y hielo seco son de -193°C . y -79°C . respectivamente.

Diluyentes usados en la congelación de semen.

Diluir 5.000 000 u de Penicilina G Sódica y 5 gr. de Dihidroestreptomocina en 30 ml. de solución de Citrato de Sodio al 2.9 %. Tomar de esta solución 7.5 ml. para cada litro de diluyente.

Diluyente sin Glicerol.

Yema de huevo 200 ml.
 Solución Citrato de Sodio estéril -
 al 2.9 % csp. 1000 ml.

Diluyente con Glicerol.

Yema de huevo 150 ml.
 Glicerol 200 ml.
 Solución Citrato de Sodio estéril -
 al 2.9 % csp. 1000 ml.

Técnica para la Congelación del Semen.

Debe hacerse en un cuarto refrigerado 5°C. aproximadamente. Soluciones, maquinaria y material usado deben estar a la misma temperatura.

- 1o. Agregar 15 ml. de diluyente sin glicerol al semen recolectado y colocarlo en un baño de agua 37°C. Refrigerar en el cuarto frío por 20 minutos.
- 2o. Sacar el frasco del semen del baño y completar la cantidad del diluyente sin glicerol. Dejar 55 minutos en reposo.

Yema de huevo 200 ml.
 Solución Citrato de Sodio estéril -
 al 2.9 % csp. 1000 ml.

Diluyente con Glicerol.

Yema de huevo 150 ml.
 Glicerol 200 ml.
 Solución Citrato de Sodio estéril -
 al 2.9 % csp. 1000 ml.

Técnica para la Congelación del Semen.

Debe hacerse en un cuarto refrigerado 5°C. aproximadamente. Soluciones, maquinaria y material usado deben estar a la misma temperatura.

- 1o. Agregar 15 ml. de diluyente sin glicerol al semen - recolectado y colocarlo en un baño de agua 37°C. - Refrigerar en el cuarto frío por 20 minutos.
- 2o. Sacar el frasco del semen del baño y completar la - cantidad del diluyente sin glicerol. Dejar 55 minutos en reposo.

30. Dividir la cantidad necesaria del diluyente con glicerol en tres partes las cuales se le añaden a in-
tervalos de 20 minutos.
40. Llenado y sellado de ampolletas, agitando constante-
mente el frasco que contiene el semen. Las ampolle-
tas son recogidas en un recipiente de agua fría.
50. Llenar las cánulas con las ampolletas dejarlas en -
reposo por dos horas y media.
60. Antes de congelar todas las ampolletas se debe de -
hacer una prueba de congelación con varias ampolle-
tas. Si los resultados obtenidos no son favorables
dejar estabilizar por otra media hora las ampolle-
tas. Si después de tres pruebas no se obtiene nin-
gún resultado satisfactorio, descartarlas.
70. Congelación.
 - a) Introducir lentamente las cánulas que contienen-
las ampolletas en un baño de Nitrógeno líquido,-
observando constantemente el nivel que debe ser-
a 3 pulgadas sobre nivel. Dejar 5 minutos.
 - b) Pasar inmediatamente al segundo baño, también de
nitrógeno líquido cuyo nivel es de $1\frac{1}{2}$ pulgada. -
Dejar 5 minutos. La temperatura de las ampolle-
tas en este momento será de -160°C .
 - c) Introducir completamente las ampolletas en Nitró-
geno líquido.

d) Almacenar después de obtener buenos resultados después de las pruebas efectuadas a las 24 horas, después de la congelación.

c) C M E (Coconut Milk Extender).

El C M E es un diluyente que contiene agua de coco en su composición y es usado para la preservación del semen a temperaturas comprendidas entre 15 y 30°C.; facilitando el manejo, conservación y transporte (7).

Este método es particularmente adaptable para países o lugares donde la conservación del semen a bajas temperaturas es económicamente difícil.

Este novedoso sistema fue introducido al país en el año 1965 por el Dr. Charles Norman, Biólogo de la Universidad de West Virginia, U. S. A. El Dr. Norman hizo sus primeros ensayos en el año de 1963 en Uganda, Kenia bajo la cooperación de la Agencia Internacional de Desarrollo (A I D).

Indice de concepción con semen de 0-7 días a temperatura ambiente 15-30°C. fueron comparados muy favorablemente con datos obtenidos de semen refrigerado de 0-3 días de duración. Pos

teriormente se hizo la comparación con semen de una y dos semanas obteniéndose los mismos resultados (7).

De 1.500 vacas inseminadas se obtuvo el 72 % de vacas que no repitieron celo entre los 60 y 90 días después de inseminadas (5 y 7).

Este trabajo fue presentado en el V Congreso Internacional de la Reproducción animal y la Fecundación Artificial celebrado en Trento, Italia en 1964.

Actualmente El Salvador y Paraguay son los únicos países que en América, trabajan con C M E.

Fórmula para la Preparación de 100 ml. de Diluyente C.M.C.

Disolver 2.2 gr. de Citrato de Sodio deshidratado, --
0.06 gr. de Penicilina "G" Sódica, 0.135 gr. de Sulfato de Dihidroestreptomocina, 0.30 gr. de Sulfanilamida, y 0.010 gr. de Sulfato de Polimixina "B" en aproximadamente 60-70 ml. de agua, bi-destilada estéril. Agregar 1 ml. de suspensión fina de Micostatín (preparado por la suspensión de 0.010 gr. de micostatín de 500 000 u en 50 ml. de agua destilada). Luego añadir 18 ml. de agua de coco que ha sido hervida durante 10 minutos y luego fil-

trada, 0.5 ml. de Catalasa estéril y 7 ml. de yema de huevo. - Mezclar bien y completar a 100 ml. Ajustar el pH del diluyente a 7.4 en el Potenciómetro con una solución de Hidróxido de Sodio al 10 % (5 y 7).

Dilución.

El semen después de haber sido analizado y estar en -- condiciones de diluir y calculando un total de 25 a 30 millones de espermatozoides por ml. se agrega al diluyente C M E (7) que estará a una temperatura aproximada de 30°C. Seguido a la dilu-- ción se envasa en dosis individuales de 1 ml. protegiéndolas de la luz directa con papel de aluminio. Una viñeta que contiene-- la clave del toro, número de registro del tro y fecha de reco-- lección, es colocada a cada dosis para su identificación.

Es de gran importancia llenar bien los viales y almace-- narlos en un lugar fresco (no necesita refrigeración) (7).

Se recomienda no usarlos más de 8 días después de la -- fecha de recolección aunque se han reportado vacas gestantes -- con semen de 12 a 16 días.

Análisis del Agua de Coco usada para la Preparación del C M E.

Conductividad eléctrica	= 6000	micro mhos
pH	= 5.00	ppm
Sólidos disueltos	= 58118	ppm
Carbonatos (CO_3^-)	= 0.00	meq/l
Bicarbonatos (HCO_3^-)	= 17.00	meq/l
Cloruros (Cl^-)	= 31.20	meq/l
Sulfatos (SO_4^-)	= 1.58	meq/l
Calcio (Ca^{++})	= 8.61	meq/l
Magnesio (Mg^{++})	= 3.70	meq/l
Sodio (Na^+)	= 21.00	p.p.m.
Potasio (K^+)	= 2080.00	p.p.m.
Sacarpsa	= 1.6 %	

Análisis efectuados en el Laboratorio de Química Agrícola, Dirección General de Investigaciones y Extensión Agrícola.

INSEMINACION DE LA VACA Y FECUNDACION

a) Inseminación de la vaca.

Debe ser efectuada por una persona que tenga conocimiento de esta técnica. Propiamente la técnica de Inseminación Artificial consiste en depositar el semen procesado en el útero, preferiblemente en el conducto de cuerpo uterino y cervix, en el tiempo propicio del celo para que los espermatozoides puedan encontrar al óvulo y fecundarlo (10).

b) Método del espéculo.

Consiste en depositar el semen en la cervix con la ayuda de un espéculo, (3) tubular de suficiente diámetro para separar las paredes de la vagina en donde es introducido; este tubo puede ser de metal o plástico cuyas dimensiones son aproximadamente de 33 cm. de longitud por 4 cm. de diámetro (en novillas se usa espéculo de diámetro menor).

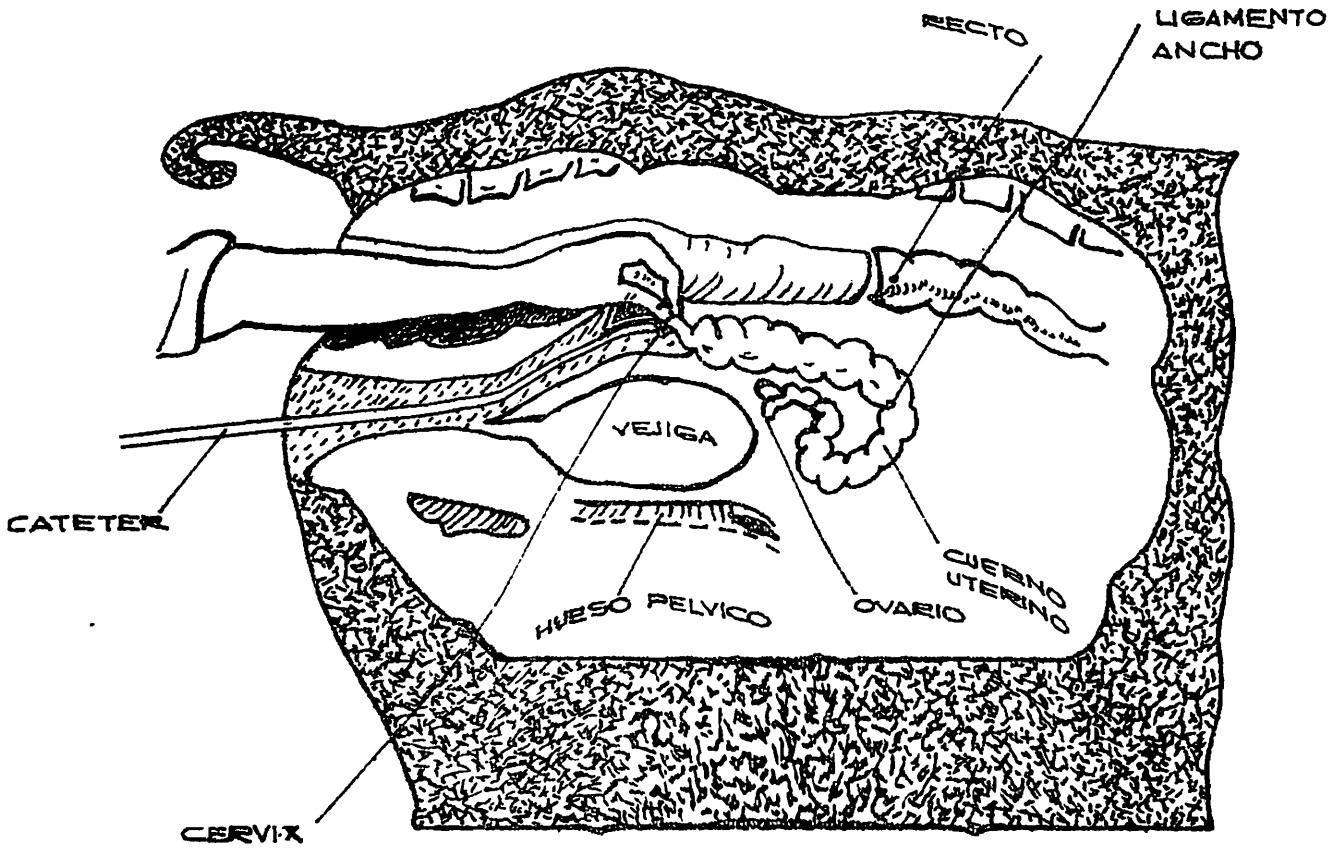
Con una fuente de luz se observa la entrada de la cervix para introducir el catéter cargado con semen. Uno de los inconvenientes de este método es la necesidad de limpiar y esterilizar el espéculo antes de usarlo en otra vaca para así evitar la-

transmisión de enfermedades.

Otro método de espéculo usado es el espéculo de Valvas fijando la cervix con pinzas de Albrechen.

c) Método Recto Vaginal.

Este método es el más popular actualmente. Se introduce el brazo enguantado en el recto de la vaca para localizar la cervix y fijarla, luego con la mano dentro se introduce un tubo de inseminación o catéter en la vagina guiando después a través de la cervix con la ayuda de la mano. Este método, (3) requiere habilidad y experiencia; sin embargo es más recomendable y aceptado por todos los centros de Inseminación Artificial.



METODO RECTO-VAGINAL

d) Fecundación.

Tiene lugar cuando el espermatozoide se une con el óvulo. El espermatozoide atraviesa la membrana del óvulo para introducirse inmediatamente en el interior del citoplasma ovular (4).

La unión de ambos elementos debe efectuarse en un tiempo reducido, puesto que los dos tienen posibilidades de una corta existencia. La presencia de cierta cantidad de Hialuronidase es de importancia fundamental para que pueda ocurrir la desnudación del óvulo, y su fecundación; por lo tanto, es necesario que la concentración espermática sea tal, que los espermatozoides en conjunto puedan proveer la cantidad de enzima suficiente. La unión del espermatozoide con el óvulo da lugar a la formación del cigote.

La fecundación o sea el período fisiológico durante el cual se organiza en el útero materno los nuevos individuos, dura desde el momento de la fecundación hasta el nacimiento. La fecundación se efectúa en los oviductos o trompas de falopio y el óvulo fecundado desciende hasta el útero en el cual se desarrolla y permanece en él hasta el nacimiento. La duración de preñez en la vaca es generalmente de 283 días y la madre proporciona la materia alimenticia a su ternero a través de la placenta (9).

R E G I S T R O S

Son indispensables los registros de reproducción llevados en las haciendas (3) lo cual permite apreciar el programa en el trabajo de los inseminadores, establecer el parentesco de las crías obtenidas, poner de manifiesto aquellos toros con un promedio bajo de fecundación. Fecha del último parto, fecha de primer celo, fecha del segundo celo, nos dan el período del ciclo de ovulación en la vaca, indicándonos si este es normal o anormal y por ende si apto para la inseminación. Este período no debe variar de 14 a 23 días y el primer celo es variable y suele aparecer entre los 55-60 días después del parto. Los registros de fechas de inseminación nos indican dentro de los próximos 60 días si la vaca está cargada o no en caso de no venir el celo de nuevo, confirmándose esto a través de la palpación efectuada por el médico veterinario.

Vacas que se inseminan más de tres veces y no quedan cargadas son consideradas problemas y deben ser sujetas a un tratamiento especial si esto fuere necesario. Un porcentaje general de estas vacas en un hato representaría un mal trabajo de parte del Inseminador o un problema de fertilidad en el hato. La información adquirida a través de este trabajo permite aplicar un tratamiento adecuado o en caso extremo eliminar la vaca, de esta manera ahorrar gasto de sostenimiento de una vaca impro

ductiva. Los trabajos de registro de reproducción llevados a -
cabo en las haciendas son supervisados por personal adiestrado-
para ello, ejemplo de estos registros son los siguientes cua---
dros.

DIRECCION GENERAL DE GANADERIA
INSEMINACION ARTIFICIAL

Departamento _____ Municipio _____

Cantón: _____

Fecha de Servicio _____
 día mes año

Nombre del Inseminador _____ No. _____

DESCRIPCION DEL TORO USADO

Clave _____ Raza _____ No. Registro _____

PROPIETARIO DE LA VACA

Nombre _____

Dirección _____
 nombre, hacienda o sitio

DESCRIPCION DE LA VACA

Nombre _____ Raza _____

Oreja o Tatuaje _____ No. Registro _____

Fecha No. Inseminador Toro usado

1o. _____

2o. _____

3o. _____

No. _____

 Firma Inseminador

 Firma Propietario Administrador

UBICACION			Fecha de Servicio			Inseminación		Tipo	Toro Usado	
Depto.	Municip.	Cantón	Día	Mes	Año	O-P	No.	Semen	Raza	Registro

No. Usuario	Vaca Inseminada		No. de Servicio	Fecha Inseminación Anterior		
	Raza	Registro		Día	Mes	Año

R E S U L T A D O S

1o. Se ha logrado el objetivo primario de introducir - el sistema de Inseminación Artificial para el mejoramiento genético de la ganadería en el país, prueba de ello es que hay hatos en todos los departamentos que trabajan eficientemente y exclusivamente con inseminación artificial.

2o. Ofrecer a todos los ganaderos semen de toros de alta calidad y con una variedad tal, que el ganadero puede escoger el sistema de cruce que más le convenga.

3o. Se obtienen anualmente más de 1.000 crías por toro en el grupo lechero, lo cual significa que hay un número grande de hembras mejoradas y algunas de ellas ya en producción y consecuentemente el correspondiente aumento en la productividad.

4o. Con el uso del C M E se le proporciona al ganadero la oportunidad de mejorar su hato en una forma práctica y a bajo costo, lo cual ha redundado en un aumento progresivo de los vientres dedicados a la inseminación artificial y como consecuencia aumentar el número de usuarios.

Análisis Reproductivo obtenido durante el año de 1969 en algu
nas Haciendas que usan C M E.

Hacienda " CANTARRANA " , propiedad del Sr. Luis Homero López,
Zacatecoluca.

Vacas inseminadas	70
Número de servicios que se les dió	116
Servicios por vaca inseminada	1.65
Número de vacas cargadas	60
Servicios por preñez	1.9
Cargadas en primer servicio	29
Fertilidad en primer servicio	46.7%
Cargadas en segundo servicio	23
Fertilidad en segundo servicio	37.09
Cargadas en tercer servicio	8
Fertilidad en tercer servicio	12.9%
Fertilidad al tercer servicio	95.0%
Cargadas de toro	-
Descartada	12
Por palpar	8

Hacienda " SAN CAYETANO ", propiedad de REGALADO HERMANOS.

Santa Ana.

Número de vacas inseminadas	146
Número de servicios que se les dió	221
Servicios por vaca inseminada	1.51
Número de vacas cargadas	78
Servicios por preñez	-
Cargadas en primer servicio	45
Fertilidad en primer servicio	40.54%
Cargadas en segundo servicio	23
Fertilidad en segundo servicio	20.7 %
Cargadas en tercer servicio	10
Fertilidad en tercer servicio	9.00%
Fertilidad al tercer servicio	70.26%
Cargadas de toro	-
Descartada	-
Por palpar	35

Hacienda " EL CIPRES ", propiedad del Sr. Salvador Gross,

Santa Ana.

Número de vacas inseminadas	30
Número de servicios que se les dió	43
Servicios por vaca inseminada	1.4
Números de vacas cargadas	22
Servicios por preñez	2
Cargadas en primer servicio	15
Fertilidad en primer servicio	50%
Cargadas en segundo servicio	6
Fertilidad en segundo servicio	20%
Cargadas en tercer servicio	1
Fertilidad en tercer servicio	3.3%
Fertilidad al tercer servicio	73.3%
Cargadas de toro	-
Descartada	-
Por palpar	-

Hacienda " SANTA MARIA ", propiedad del Sr. Pedro Mezquita,

Santa Ana.

Número de vacas inseminadas	27
Número de servicios que se les dió	38
Servicios por vaca inseminada	1.4%
Número de vacas cargadas	20
Servicios por preñez	1.9%
Cargadas en primer servicio	13
Fertilidad en primer servicio	65%
Cargadas en segundo servicio	5
Fertilidad en segundo servicio	25%
Cargadas en tercer servicio	2
Fertilidad en tercer servicio	10%
Fertilidad al tercer servicio	100%
Cargadas do toro	-
Descartada	1
Por palpar	6

Hacienda " SAN CARLOS ", Sucesión Carlos Arce,

Sonsonate.

Número de vacas inseminadas	79
Número de servicios que se les dió	157
Servicios por vaca inseminada	1.98
Número de vacas cargadas	39
Servicios por preñez	4.02
Cargadas en primer servicio	21
Fertilidad en primer servicio	46.6%
Cargadas en segundo servicio	8
Fertilidad en segundo servicio	17.77%
Cargadas en tercer servicio	9
Fertilidad en tercer servicio	20.00%
Fertilidad al tercer servicio	84.43%
Cargadas de toro	1
Descartada	2
Por palpar	32

Hacienda " TONALA ", propiedad del Sr. José Venutolo,

Sonsonate.

Número de vacas inseminadas	126
Número de servicios que se les dió	186
Servicios por vaca inseminada	-
Número de vacas cargadas	75
Servicios por preñez	2.48
Cargadas en primer servicio	62.3%
Cargadas en segundo servicio	17
Fertilidad en segundo servicio	22.07%
Cargadas en tercer servicio	10
Fertilidad en tercer servicio	12.9%
Fertilidad al tercer servicio	97.27%
Cargadas de toro	12
Por palpar	49

Hacienda " EL MILAGRO ", propietario Sr. José Roberto Castillo,

Sonsonate.

Número de vacas inseminadas	76
Número de servicios que se les dió	215
Servicios por vaca inseminada	2.82
Número de vacas cargadas	62
Servicios por preñez	3.46
Cargadas en primer servicio	24
Fertilidad en primer servicio	31.5%
Cargadas en segundo servicio	21
Fertilidad en segundo servicio	27.6%
Cargadas en tercer servicio	17
Fertilidad en tercer servicio	22.3%
Fertilidad al tercer servicio	81.56%

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

1. DAVIS, Richard F. "La vaca lechera", primera edición, p. - 105-108, México 1963.
2. DERIVAUX, J "Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los animales domésticos", p. 231-235, Zaragoza, España 1961.
3. DIRECCION GENERAL DE GANADERIA "Manual de Inseminación Artificial" Ministerio de Agricultura y Gnadería, El Salvador 1967.
4. HOARD'S, Dairyman "La Esterilidad del Ganado lechero", p.- 9-18 Traducción publicada por "Carnation Farms Breeding Service 1964.
5. MOTTA, José Medina "Novedosa modalidad en Inseminación Artificial", El Surco Latinoamericano, -- Vol. LXXII No. 4, 1967.
6. NAVAS, Salvador "Evaluación del Programa de Inseminación Artificial. Dirección General de Ganadería, El Salvador 1969.
7. NORMAN, Charles "Further Studies on the preservation of -- mammalian sperm at variable temperatures p. 270-271, Department of Biology West - Virginia University, U. S. A. 1964.
8. PATRONATO DE BIOLOGIA ANIMAL "Técnica de Laboratorio de Inseminación Artificial, Madrid, España.

9. VATTI, Guiseppi "Ginecologia y Obstetricia Veterinaria p. -
48, 79, 94, 104, 1962.
10. ZANJANIS, R. "Diagnostic an Therapeutic Thecniques in Ani--
mal Reproduction", cap. 12, p. 85, Baltimo
re 1962.