

CONGELACION DE SEMEN BOVINO EN PAYETTS¹

ISMAEL J. NAVARRO V., D. M. V. Z. *

HERNANDO SALAMANCA C., D. M. V. Z. **

INTRODUCCION

En Francia los trabajos de Jondet (1964) y Cassou (1964) demostraron el éxito del Semen congelado en vapor de nitrógeno líquido en recipientes que consisten de un pequeño tubo plástico, de paredes delgadas y con capacidad de 0,25 cc., 0,5 cc. y 1,2 cc. pequeño, mediano

grande respectivamente, en las cuales el semen sufre una congelación uniforme y una rápida descongelación, pero en el presente trabajo hemos utilizado solamente la mediana, de capacidad de 0,5 cc. Este método de congelación de semen en Payetts ha ido tomando mayor importancia en los últimos tiempos por obtenerse un buen porcentaje de fertilidad y por la facilidad de conservarse un buen número de éstas en poco espacio dentro del termo de nitrógeno líquido.

En Skara, Suecia, Dyrendahl (1967) ha presentado algunas modificaciones de este método cuyo empleo se ha difundido mucho en los países Escandinavos. Por esto, el propósito del presente trabajo va encaminado a divulgarlo más para su posible utilización en el país, aunque éste representa una gran labor en el laboratorio durante su proceso.

Por otra parte, en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional, en Bogotá, se en-

saya un nuevo diluyente similar al Laiciphos con el objeto de reemplazar a este último, que tiene una duración de seis meses y cuyo contenido no se conoce, siendo también de difícil consecución en nuestro medio. Los resultados obtenidos con respecto a la motilidad progresiva fueron significativamente buenos.

MATERIALES Y METODOS

El medio diluyente con Laiciphos 231 se preparó para su inmediato uso, siguiendo las modificaciones de Dyrendahl (1967), en la siguiente forma:

1. El contenido de un sobre de Laiciphos se disuelve en 400 cc. de agua destilada a temperatura de 40°C., lo que da 550 cc.

2. Yema de huevo cantidad original de 100 cc. se reduce a 75 cc., más 100 cc. de agua destilada a temperatura de 40° C.

3. Las dos fracciones (1ª y 2ª) se mezclan vigorosamente. No se adicionan antibióticos por encontrarse incluidos en el Laiciphos.

¹ Tubo plástico delgado.

Profesor asociado, Jefe Unidad Reproducción Animal.

** Profesor Asistente, Reproducción Animal.

Asimismo se ensaya un nuevo diluyente similar al Laiciphos, con el objeto de reemplazar a este último.

DILUCION

La mezcla de las dos fracciones (1.— y 2.—) se divide en dos porciones iguales. La primera porción para diluirla con el semen directamente, previa evaluación del mismo a la temperatura de 30°C — 32°C en que se recibe el semen (iguales temperaturas) Settergren (1967).

El título de la dilución varía según su concentración, pero en términos promedios, para un material lechoso, denso, se utiliza la proporción de 1 cc. de semen y 9 cc. de la primera porción, luego debe ser llevada a la nevera a temperatura de +4°C por una o dos horas. Cuando la temperatura llega a +20°C se agregan pedacitos de hielo cada cinco minutos para conseguir un enfriamiento correcto, por descenso gradual, Settergren (1967).

PREPARACION Y ADICION DE LA SEGUNDA PORCION CON GLICEROL

La segunda porción se coloca a temperatura de 40°C y el glicerol se calienta en baño María a la temperatura de 55°C — 60°C para incrementar su fluidez, Settergren (1967). El glicerol se agrega a esta segunda porción en la proporción del 10% y también se lleva a la nevera a la temperatura de +4°C, Dyrendahl (1967).

Una vez que el semen diluido en la primera porción completa su tiempo de estabilización o reposo por una a dos horas a temperatura de 40°C, se procede a verificar la adición de la segunda porción glicerinada a la primera porción con el semen diluido y a iguales volúmenes. Esta adición se hace gradualmente y para

ello se divide en cuatro partes iguales, cada una de las cuales se va agregando la primera porción a intervalos de 10 a 15 minutos; de tal manera que el volumen del semen diluido se va aumentando lenta y gradualmente. Esta misma adición puede hacerse gota a gota, estando la primera porción en movimientos oscilatorios y todo el material dentro de un recipiente a temperatura de 4°C. El tiempo empleado en cualquiera de las dos formas de la glicerinización oscila entre 30 y 45 minutos y el título final de la dilución del glicerol al 5%.

PREPARACION Y LLENADO DE LAS PAYETTS

Después de que la glicerinización ha terminado, el llenado de las Payetts puede comenzarse inmediatamente en un cuarto frío o en una cabina refrigeradora a temperatura de 4°C. Las Payetts deben estar marcadas con el nombre o número del toro y fecha de la congelación, sujetas en un fijador (Clips) cerca de su tapón de gasa, dejando libre su extremo abierto en forma ordenada. En cada fijador se colocan 15 Payetts y se llevan al refrigerador hasta el momento de llenarse. Para esto último es necesario colocar un peine plástico succionador a las Payetts por su extremo (con tapón de gasa). Este peine debe ir conectado a una válvula succionadora o aspirador (Filter Pump) fijada a una llave de agua, o también el peine debe ir conectado a un compresor.

El semen diluido se coloca en un recipiente de boca ancha, previa homogenización, para luego verificarse el llenado, después de lo cual es necesario sacudirlas suavemente sobre una toalla estéril para que el extremo pueda taponarse después con un polvo plástico.

TIEMPO DE EQUILIBRIO

Terminado el llenado de las Payetts, éstas se colocan sueltas en un recipiente que contenga agua a temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ por tiempo de cuatro horas y media, durante las cuales el tapón plástico se ha solidificado en parte; luego se sacan de este recipiente y se colocan entre dos toallas estériles a temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ para secarlas y eliminar el resto de tapón plástico que queda adherido, como una goma, por fuera del extremo.

Las Payetts deben rodar separadas unas de otras con una ligera y cuidadosa presión durante el secado; de lo contrario, las Payetts pueden sufrir algún daño durante la congelación.

Si las Payetts no han estado en el agua a temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ por un tiempo suficiente, el material del tapón plástico que se adhiere por fuera de los extremos, se vuelve muy gomoso y es casi imposible de eliminar.

Cuando las Payetts se han secado, se colocan verticalmente con el objeto de que las burbujas de aire que hayan quedado adentro, se dirijan al extremo con tapón de gasa; inmediatamente se colocan uniformemente en una rampa de congelación, lo que será fácil si las Payetts están completamente secas y las partes externas del extremo con tapón plástico están también libres de este material adhesivo. El proceso es difícil si las Payetts están húmedas y pegajosas.

Al colocar las Payetts ordenadamente en las rampas de congelación, éstas deben permanecer $\frac{1}{2}$ hora más dentro de la cabina de refrigeración a temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ para así completar un tiempo total de equilibrio de cinco horas, que es lo recomendado en Suecia por dar un excelente resultado, Dyrendahl (1967), Settergren (1967).

PREPARACION PARA LA CONGELACION

Para poderse efectuar la congelación de las Payetts en una forma correcta, es necesario un recipiente de boca ancha, que en este caso puede ser un termo de nitrógeno líquido Linde 250, MVE A9000-o-RCB400 T. Estos mismos termos o unidades de congelación sirven para el almacenamiento y conservación del semen congelado. Por esto es necesario colocar verticalmente unos tubos metálicos, dentro de los cuales se colocan otros recipientes plásticos (gobelets).

Cuando se va a comenzar la congelación, se coloca una parrilla sobre los bordes de los tubos metálicos. Esta parrilla debe estar en forma adecuada para que su orificio más grande coincida con la boca de uno de los tubos que contienen los recipientes plásticos (gobelets) destinados para el almacenamiento y conservación de las Payetts.

Antes de efectuarse la congelación, el nivel del nitrógeno debe ajustarse. Si se usa un termo MVE A9000, el nivel del nitrógeno debe estar 1 cm. debajo de la parrilla. Después de que esto se haya chequeado, se coloca la tapa del termo por unos cinco minutos con el objeto de que la temperatura se estabilice.

CONGELACION

La congelación se efectúa por simple colocación cuidadosa de las rampas que contienen las Payetts sobre la parrilla. Las Payetts estarán entonces 4 cms. arriba del nivel del nitrógeno en un termo Linde 250 y RCB 400 T respectivamente, y 5 cms., cuando se usa un termo MVE A 9000. Dyrendahl (1967). Swesson (comunicación personal 1967). La tapa del termo se coloca inmediatamente para evitar la turbulencia del nitrógeno líquido.

La temperatura de las Payetts se baja lentamente y alcanza -100°C en cinco minutos. Después de siete minutos se retira la tapa del termo y las Payetts se recogen con la mano enguantada para pasarlas posteriormente a las gobelets que se encuentran debajo de la parrilla.

Cuando todas las Payetts se han congelado, se retira la rampa que las contenía. Si se tiene que hacer otra congelación, es necesario chequear el nivel de nitrógeno y colocar la tapa de nuevo por lo menos cinco minutos para estabilización de la temperatura.

MANEJO DE LAS PAYETTS

En el momento de verificarse la inseminación a una vaca o novilla, se requiere:

1. Sacar una Payett, plenamente identificada y colocarla dentro de un termo pequeño que contenga agua a temperatura de 35°C a 40°C por cinco minutos.

2. Sacar la Payett del termo y secarla con papel de filtro.

3. Introducirla en el Catéter o pistola especial en forma que su extremo taponado con el polvo plástico solidificado, quede libre o sea en su parte superior.

4. Cortar este extremo libre para eliminar todo el tapón plástico.

5. Colocar una funda plástica que cubra el extremo descubierto de la Payett y todo el catéter especial. Esta funda presenta un pequeño orificio en su extremidad anterior con el objeto de que pueda salir solamente el semen cuando el émbolo del catéter impulse el tapón de gasa con polvo plástico que presenta la Payett, el cual a su vez impulsa al semen.

6. El catéter con la Payett y la funda plástica ya armados se introduce en el cuello uterino, depositando el semen en el sitio apropiado como en los sistemas standards de inseminación.

7. Terminada la inseminación, se sacará el catéter con su funda plástica y la Payett vacía. Estas dos últimas se desechan pero el catéter especial metálico puede utilizarse en las siguientes inseminaciones.

BIBLIOGRAFIA

- CASSOU, R. Medium- Sized Strawes at L'Aigle A. I. Centre. Animal Breeding Abst. Sept. 1967. Vol. 35 Nº 3 Absts. 2150-3245.
- CASSOU, R. La méthode des paillettes en plastique adaptée à la généralisation de la congélation. Proc. Inter. Cong. Anim. Repr. and AI, Trento (1964).
- DYRENDahl, I. The Payett work in the Laboratory. Sweden (1967).
- JONDET, R. Quatre annes de congelation rapide du sperme de Taureau. VI Cong. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif. Paris, 1968, Vol. II.
- JONDET, R. Influence de la reproduction du volume de la dose de sperme congelé et de sa teneur en spermatozoides sur le fecondation de vaches inseminées artificiellement. VI Cong. Inter. Reprod. Anim. Insem. Artif. Paris 1968. Vol. II.
- JONDET, R. Maitien du pouvoir fécondant du sperme de taureau, conditionné en paillettes après congelation rapide dans les vapeurs d'azote liquide. Bul. Acad. Vet. France (1964).
- SETTERGREN, I. Deep Freezing of Bull Semen. Royal Veterinary. College, Sweden (1967).
- SETTERGREN, I. Technique of deep Freezing Semen. Royal Veterinary. College Swede (1967).
- SWENSSON, T. Comunicación personal. Suecia. (1968).
- TURBIN, V. F. Current methods of freezing bull semen. Animal Breeding Abstracts 1968. Vol. 36, Nº 3, Absts 2214-3287.