Universidad Nacional de Lomas de Zamora

Facultad de Ciencias Agrarias

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN PRESERVADO EN OVINOS Y CAPRINOS

Alumna: Spinelli, María Victoria

- Agosto 2016-

Inseminación artificial con semen preservado en ovinos y caprinos

Informe final correspondiente al Plan de Especialización (PE) *Biotecnologías reproductivas en ovinos y caprinos* presentado como parte de los requisitos del Espacio de Prácticas Profesionales (Res. C.A.A 099) por la alumna Spinelli, María Victoria.

Comité tutorial:

- Director: Dra., Ing. Agrónoma Marcela Isabel Cueto (Investigadora, Grupo de Reproducción y Genética, EEA INTA Bariloche)

- Codirector: Dra., Ing. Zootecnista Laura Simonetti (Profesor Adjunto, Cátedras de Rumiantes Menores y Producción Animal II, Facultad de Cs. Agrarias, UNLZ)

Comisión Evaluadora:

- MSc., Ing. Zootecnista Gloria Lynch (Cátedra de Rumiantes Menores, Facultad de Cs. Agrarias, UNLZ)

- Dra., Ing. Zootecnista Mabel Tartaglione (Cátedras de Fisiología Animal y Reproducción Animal, Facultad de Cs. Agrarias, UNLZ)

- Dr., Méd. Vet. Oscar Rivera (Cátedras de Anatomía y Fisiología Animal y Anatomía, Facultad de Cs. Agrarias, UNLZ)

Coordinador del Taller: Ing. Agrónomo Luis González

INDICE

RESUMEN 4

ABSTRACT 5

INTRODUCCIÓN 6

1. La inseminación artificial en la especie ovina y caprina 7

1.1. Recolección de semen.....9

1.2. Evaluación Seminal 11

1.3. Diluyentes 13

1.4. Métodos de Inseminación Artificial.....15

2. Métodos de conservación del semen 16

2.1. Semen enfriado y refrigerado.....16

2.1.1. Eficiencia reproductiva en ovinos 20

2.1.2. Eficiencia reproductiva en caprinos 27

2.2. Semen congelado 30

2.2.1. Inseminación cervical con semen congelado 31

2.2.2. Inseminación intrauterina con semen congelado.....34

DISCUSION GENERAL 36

CONCLUSIONES.....38

BIBLIOGRAFIA 39

RESUMEN

La posibilidad de preservar el semen ovino y caprino ha sido un tema prioritario de investigación desde que se consideró a la inseminación artificial (IA) como técnica de reproducción apropiada para difundir las características productivas de los reproductores de alto valor genético (Cueto y Gibbons, 2010). El semen puede preservarse por períodos cortos de 6 a 24 horas (semen refrigerado o enfriado) o períodos ilimitados (semen congelado). Se denomina semen refrigerado cuando su preservación se lleva a cabo a 5ºC y enfriado cuando se realiza a 15ºC. El semen congelado se conserva a -196ºC en termos con nitrógeno líquido (Cueto y Gibbons, 2010). El objetivo de esta monografía es realizar una revisión sobre la IA mediante el uso de semen preservado en ovinos y caprinos, haciendo hincapié en la utilización de semen enfriado y refrigerado. El empleo de semen preservado es una práctica económicamente viable, de fácil implementación, con resultados aceptables y prometedores. Mediante la adecuación de los protocolos de sincronización de estros e IA a los diferentes sistemas de producción, se posibilita el empleo eficiente de las técnicas reproductivas, alcanzando tasas de preñez de entre 40 a 50%. En particular, el uso de semen refrigerado o enfriado representa una alternativa de gran interés debido a la posibilidad de disminuir considerablemente el costo del material genético y del equipamiento. Por otro lado, se facilitaría la implementación de esta metodología a gran escala debido a la factibilidad de su ejecución a campo. En su conjunto, estas ventajas favorecerían el uso del semen preservado por cortos períodos de tiempo en programas de mejoramiento genético en poblaciones de rumiantes menores.

Palabras clave: inseminación artificial – ovinos – caprinos – semen refrigerado – semen enfriado – semen congelado – fertilidad

ABSTRACT

The possibility of preserving sheep and goat semen has been a research priority since artificial insemination (AI) was considered an appropriate reproduction technique to disseminate productive characteristics of males of high genetic value (Cueto and Gibbons, 2010). The semen can be preserved either for short periods of 6-24 hours (refrigerated or cooled semen) or for unlimited periods (frozen semen). The preservation temperatures for refrigerated and cooled semen are 5ºC and 15ºC, respectively, while frozen semen must be stored at -196°C in liquid nitrogen thermos (Cueto and Gibbons, 2010). The aim of this monograph is to review on AI using preserved semen in sheep and goats, emphasizing the use of refrigerated and cooled semen. The use of preserved semen is an economically viable practice, easy to implement, with acceptable and promising results. By adapting the protocols of estrus synchronization and AI to different production systems, efficient use of reproductive techniques is possible, achieving acceptable pregnancy rates (40-50%). In particular, the use of refrigerated and cooled semen is an alternative of great interest because of the possibility of considerably reducing the cost of genetic material and equipment. On the other hand, the implementation of this methodology at large scale would be facilitated due to the feasibility of its implementation under field conditions. Taken together, these advantages favor the use of semen preserved for short periods of time in breeding programs of small ruminants.

Keywords: artificial insemination – ram – goat – refrigerated semen – cooled semen – frozen semen – fertility

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva ampliamente utilizada que tiene como objetivo principal contribuir a la multiplicación de las características productivas de los reproductores de mayor valor genético, permitiendo incrementar la progenie de un determinado macho con respecto a la que se lograría por servicio natural.

En nuestro país, durante la época de mayor demanda de material genético que se presenta en la estación reproductiva, los carneros y machos cabríos de alto valor económico son a veces utilizados por distintos establecimientos mediante el servicio a corral o la IA vaginal con semen fresco. Durante este manejo los machos están sujetos a riesgos físicos y sanitarios, así como a una intensa actividad que les suele provocar cierto grado de estrés (transporte, cambios de ambiente y de alimentación, etc.); la asociación de estos factores puede en muchas ocasiones afectar la calidad seminal (Naim, 2007). La preservación del semen favorece un uso más eficiente y prolongado de los reproductores en programas de mejoramiento genético, al permitir su utilización durante y fuera de la estación reproductiva (Olivera *et al*., 2005).

Con el avance de la IA, ha tomado relevancia la posibilidad de preservar el semen por distintos períodos de tiempo, debido a que los espermatozoides sólo tienen una sobrevivencia limitada fuera del aparato reproductor (Cueto y Gibbons, 2010). El semen puede preservarse por períodos cortos de 6 a 24 horas (semen refrigerado o enfriado) o períodos ilimitados (semen congelado). Se denomina semen refrigerado cuando su preservación se lleva a cabo a 5ºC y enfriado cuando se realiza a 15ºC. El semen congelado se conserva a -196ºC en termos con nitrógeno líquido (Cueto y Gibbons, 2010). Estas técnicas se basan en la disminución o inhibición en forma reversible del metabolismo espermático, evitando de esa manera el agotamiento de recursos energéticos y la formación de productos finales tóxicos del propio metabolismo de los espermatozoides (Dinatolo, 2011). En general, existe escasa información en referencia a la utilización de semen enfriado tanto en la especie ovina como caprina. Sin embargo, se han reportado numerosos ensayos evaluando semen refrigerado, principalmente en ovinos.

El uso de semen refrigerado y enfriado se justifica debido a la alta demanda de material genético, el bajo costo del equipamiento requerido, la practicidad en el procedimiento de manejo del semen y en su factibilidad de implementación a campo, considerando a su vez que entre un 20 a 40% de los sementales responde pobremente al congelamiento seminal (Vidament *et al.,* 1997; Naim, 2007; Dinatolo, 2011). En su conjunto, estas ventajas favorecerían el uso del semen preservado por cortos períodos de tiempo como herramienta de difusión genética, facilitando la realización de programas de mejoramiento genético en poblaciones de rumiantes menores.

El objetivo de esta monografía es realizar una revisión sobre la inseminación artificial mediante el uso de semen preservado en ovinos y caprinos, haciendo hincapié en la utilización de semen enfriado y refrigerado.

1. La inseminación artificial en la especie ovina y caprina

La IA es la técnica por la cual se introduce una fracción o dosis de semen en el tracto genital femenino por medios instrumentales. De este modo, el hombre interviene en el proceso reproductivo, de acuerdo a objetivos de producción específicos (Naim, 2007).

La IA es considerada como la primera generación de biotecnologías reproductivas, es una potente herramienta para desarrollar programas de mejora genética de poblaciones ovinas y caprinas, logrando así incrementar la productividad y rentabilidad de los rebaños. Permite fundamentalmente la rápida y masiva difusión de las características deseables de los reproductores con alto potencial productivo, usar machos viejos o lesionados y, además, permite el control de algunas enfermedades de transmisión sexual (Hernández Ballesteros *et al.,* 2015).

En algunos países, la IA ha tenido un gran desarrollo y ha servido como herramienta fundamental para el mejoramiento genético en los ovinos y caprinos. Se estima que se inseminan anualmente más de 500.000 ovejas en Australia, 300.000 en Francia, 60.000 en España y 50.000 en Canadá (Hernández Ballesteros *et al.,* 2015). En Sudamérica la IA ovina se ha desarrollado exitosamente, en cantidad apreciable en

Brasil, Argentina y Uruguay y en mucho menor escala en otros países (Sepúlveda Becker, 2012).

En el ganado caprino la IA está relativamente poco extendida, sólo países como Francia, cuyo objetivo primordial es la producción láctea para la fabricación de quesos de alta calidad, tienen programas de selección y mejora genética en los que la IA juega un papel fundamental, inseminando aproximadamente 80.000 animales por año (Delgado Bermejo *et al.*, 2014).

Sin embargo, actualmente la IA en ovinos y caprinos es limitada en comparación con otras especies domésticas, debido fundamentalmente a resultados variables y a las bajas tasas de fertilidad alcanzadas (Garde López-Brea, 2002; Aisen, 2004; Palacín *et al.,* 2012).

La aplicación de la IA en el ganado ovino y caprino presenta dos grandes limitaciones. La primer limitación se presenta como consecuencia de la anatomía particular del aparato reproductor de la hembra (especialmente en la oveja), cuyos anillos cervicales son más numerosos e irregulares que en otras especies; esto condiciona la eficacia de la IA, al constituir una barrera física para la penetración del catéter de inseminación hasta el interior del útero. La segunda limitación hace referencia a la menor resistencia del semen ovino y caprino a la criopreservación en comparación con el de otras especies (Aisen, 2004; Dinatolo, 2011; Palacín *et al.,* 2012). En este sentido, se ha observado que los espermatozoides tanto del ovino como del caprino son más sensibles al estrés térmico por frío que los de otras especies tales como el perro o el hombre (White y Darin-Bennett, 1976; Quintero Moreno, 2003).

Finalmente, otros inconvenientes que presenta la IA son la mayor demanda de mano de obra, fundamentalmente calificada, y el aumento de costos, en especial cuando es asociada a técnicas tales como la sincronización, detección de celos y la utilización de semen congelado.

1.1. Recolección de semen

El éxito de la IA depende, inicialmente, de la calidad del semen empleado, la cual varía de acuerdo a la época del año, el método de recolección y a factores intrínsecos de cada macho (Naim, 2007). Para que dicho semen presente excelentes características biológicas, se hace necesario que los animales se encuentren en perfectas condiciones y que el método empleado para la obtención espermática sea aplicado correctamente (Garde López-Brea, 2002).

El semen puede ser colectado mediante vagina artificial o a través de estimulación eléctrica (electroeyaculación).

En la actualidad, el método más utilizado y recomendado es la vagina artificial, ya que permite obtener eyaculados con alta motilidad y concentración espermática. Se requiere de un dispositivo de sencilla construcción, que imita la vagina de la oveja o cabra y estimula la eyaculación al proveer estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) (Cueto *et al*., 1993). El mayor inconveniente que presenta la recolección de semen por el método de la vagina artificial es la necesidad de entrenar a los machos para que eyaculen dentro de dicho dispositivo (Aisen, 2004).

Para la recolección del semen mediante este método, el operador se coloca al lado de la hembra en celo, en cuclillas, y cuando el macho intenta la “monta”, desvía el pene lateralmente para enfrentarlo a la vagina artificial (Figura 1). Luego de la eyaculación, se coloca la vagina en posición vertical, de modo que el semen, por acción de la gravedad, descienda dentro de la copa de colecta (Naim, 2007).

***Figura 1**: Recolección de semen con vagina artificial (Foto tomada durante las prácticas del curso de Fisiología de la reproducción y biotecnologías reproductivas, EEA INTA Bariloche, 2015).*

En la electroeyaculación, el semen se obtiene por medio de un estimulador eléctrico, vía rectal, alimentado mediante 220 voltios (con transformador reductor), por una batería (12 v) o una dinamo. La sonda introducida en el recto posee dos o más electrodos y proporciona descargas de 4 a 15 voltios (Aisen, 2004).

Cuando el semen es colectado por electroeyaculación, suele presentar contaminación con orina, obteniéndose volúmenes mayores pero con menor concentración espermática (Cueto *et al.,* 1993), menor resistencia al shock térmico y a los procesos de congelación y descongelación (Garde López-Brea, 2002). Esto, sumado al mayor estrés del animal, que permite sólo 1-2 extracciones por día, limita esta técnica en una alternativa a aplicar sólo cuando los machos no puedan ser entrenados para la obtención seminal por medio de la vagina artificial, presentan defectos físicos no hereditarios o problemas físicos que pueden hacer imposible la monta (Hafez, 1996; Naim, 2007).

Una vez recogido el semen, es necesario que no sea expuesto a condiciones desfavorables que afecten su viabilidad (cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa e impurezas).

1.2. Evaluación Seminal

Para la evaluación de la calidad del semen existen numerosas pruebas que difieren en su grado de especificidad y en su correlación con la fertilidad *in vitro* e *in vivo* (Aisen, 2004).

El material seminal se puede valorar macro y microscópicamente, permitiendo determinar la calidad, viabilidad y fertilidad de los espermatozoides. Si bien no existe una única prueba que permita predecir con exactitud la eficiencia reproductiva de los eyaculados, la combinación de varias de ellas aporta la información necesaria para poder seleccionar los eyaculados con mayor potencial de fecundación (Aisen, 2004).

La observación del color del semen, así como la apreciación de su motilidad masal, son importantes para decidir si se procederá a la utilización del eyaculado. El volumen y la concentración espermática deben ser estimados antes de su utilización, para realizar una correcta dilución según el volumen y número de espermatozoides totales a inseminar por dosis (Cueto *et al.*, 1993).

- ***Color***

El semen del carnero es normalmente blanco cremoso. El semen de los machos cabríos suele presentar un color más amarillento. Deben descartarse los eyaculados que presentan coloración blanco-rosácea que indica existencia de sangre, o gris que indica algún tipo de infección en el aparato reproductor (Aisen, 2004).

- ***Volumen***

El volumen promedio de un eyaculado es de 1 ml dependiendo de la raza, edad, estado general del macho y destreza del operario. En general, se descartan aquellos eyaculados con un volumen menor de 0,4 ml. Puede medirse directamente en el tubo colector, si está graduado o bien con una pipeta calibrada (Aisen, 2004).

- ***Motilidad masal***

La principal característica y requisito de la capacidad fecundante del semen es que presente motilidad masal. El examen microscópico del movimiento en masa del semen constituye una metodología simple, aunque subjetiva, para evaluar la calidad seminal antes de su utilización, directamente en la IA o proceder a su refrigeración o congelamiento (Naim, 2007).

El movimiento ondulatorio en masa puede observarse mediante un microscopio con una pequeña gota de semen puro, situada en una platina térmica. Se podrá tener una idea de la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas. La motilidad se estima por el vigor del movimiento de las ondas, en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0 mínimo; 5 máximo). Para proceder al congelamiento de un eyaculado, se recomienda que su motilidad masal sea de 4 o mayor (Cueto *et al*., 1993).

- ***Concentración espermática***

Los valores normales de concentración espermática para carnero y macho cabrío oscilan entre 3000 a 7000 x 10^6 espermatozoides/ml. Los métodos más utilizados para la determinación de la misma son el fotocolorímetro y el recuento en cámara de Neubauer. Si bien ambos métodos son precisos, el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, en comparación con la cámara de Neubauer, pero su costo es más elevado (Cueto *et al*., 1993).

Otras evaluaciones del semen incluyen motilidad individual, morfología espermática y relación espermatozoides vivos/muertos que generalmente escapan a la evaluación de rutina.

1.3. Diluyentes

El semen obtenido y evaluado como apto, requiere un procesamiento adecuado para garantizar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el tiempo que medie entre la eyaculación y su utilización para la siembra (Aisen, 2004).

El semen que se emplea inmediatamente después de su recolección, podrá mantenerse a 28-30°C en baño termostático durante la inseminación, ya sea puro o diluido, por un tiempo no mayor a 40-60 minutos. En caso de ser necesario, la dilución de semen se realiza en forma aproximada, asegurándose una cantidad de 100 a 150 millones de espermatozoides totales por dosis de inseminación de 0,02-0,25 cc. (Cueto y Gibbons, 1995).

En el caso del semen criopreservado, ya sea refrigerado, enfriado o congelado, será necesario proceder a la dilución del eyaculado para proporcionar un medio adecuado para su conservación.

La dilución del semen se lleva a cabo por razones técnicas y biológicas:

- Razones técnicas: incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un gran número de hembras (uso intensivo del padre).
- Razones biológicas: proveer a los espermatozoides de nutrientes y protección contra el enfriamiento y congelamiento (Cueto *et al*., 1993).

Los diluyentes para semen refrigerado pueden ser sintéticos o naturales. Los diluyentes sintéticos están formulados en base a TRIS (hidroximetilaminometano) o citrato como buffers, y azúcares, como glucosa o fructosa, que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía. Además, deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5°C como la yema de huevo. Los diluyentes naturales se preparan en base a leche descremada en polvo al 10%. La fracción proteica de la leche es la responsable de sus propiedades como diluyente, las cuales son: actuar como buffer ante cambios de pH, actuar como agente quelante y proteger a los

espermatozoides durante la reducción de temperatura (Dinatolo, 2011). Se le añadirá glucosa al 1% y una combinación de Estreptomicina y Penicilina.

En el caso de semen enfriado, puede utilizarse un diluyente en base a leche descremada en polvo al 10%, no siendo necesaria la adición de glucosa. Los diluyentes en base a leche evidencian una mayor eficiencia para la criopreservación del semen a 15ºC, siendo recomendable utilizar diluyentes en base a yema de huevo de gallina cuando se utiliza la refrigeración (Naim, 2007).

Además, en el caso de semen congelado, es necesario adicionar un crioprotector. El glicerol es el agente crioprotector más comúnmente utilizado en diluyentes para la congelación de semen. Esta molécula atraviesa rápidamente la membrana plasmática del espermatozoide, impidiendo el crecimiento de los cristales de hielo. Debido a una acción tóxica del glicerol, se ha reducido su concentración para la congelación de semen ovino a 4–8%. Para el caprino se lo utiliza en concentraciones más altas (7–9%) (Aisen, 2004).

Si bien los diluyentes anteriormente nombrados son los más utilizados, en la actualidad, la variedad de preparación de medios de conservación es muy amplia.

Un problema específico en la conservación de semen caprino ha sido el efecto perjudicial del plasma seminal en la viabilidad de los espermatozoides en diluyentes que contengan yema de huevo o en medios a base de leche (Leboeuf *et al.,* 2006). La especie caprina presenta ciertas particularidades en la composición de su plasma seminal. Una de ellas es la existencia de una fracción proteica (BUIII) procedente de las glándulas bulbouretrales que interacciona con la leche utilizada en el diluyente produciendo inhibición de la motilidad de los espermatozoides. Para evitar los efectos perjudiciales de la misma, algunos investigadores sugieren “lavar” el semen, es decir separar y eliminar el plasma seminal mediante centrifugación antes de mezclar el semen con el diluyente (Gibbons *et al*., 1993). Este procedimiento es igualmente recomendado cuando se emplean diluyentes que contengan yema de huevo. En este último caso, otros autores encontraron que el calentamiento a 60°C durante 2 a 5 minutos puede ser igualmente útil (Leboeuf *et al.,* 2006). Estos mismos autores reportaron que si

se utiliza un diluyente a base de TRIS, siempre y cuando la proporción de yema huevo no superase el 2%, no sería necesaria la eliminación del plasma seminal.

1.4. Métodos de Inseminación Artificial

La IA en ovinos y caprinos puede realizarse por vía vaginal (IA cervical) o mediante la técnica laparoscópica, por vía intrauterina. Estos métodos difieren en complejidad, costos y en su tasa de éxito**.**

a) Inseminación cervical

Se trata de un método de inseminación económico y relativamente sencillo. El cérvix se localiza a través de un espéculo provisto de una fuente de luz (vaginoscopio). Debido a la complicada anatomía cervical ovina generalmente sólo es posible depositar el semen en el primer pliegue del cuello del útero.

Se ha demostrado que cuanto más profundamente se deposita la dosis seminal mayor es el índice de fertilidad. En este sentido, Álvarez *et al.* (1996) y Dinatolo (2011) concluyeron que la deposición seminal lo más profundamente posible en el cuello uterino de la oveja, siempre y cuando no sea traumático, conduce a una mejora significativa en la fertilidad. A su vez, otros autores (Eppleston, 1992; Dinatolo, 2011) reportaron un incremento en la fertilidad de entre un 7 a un 12% por cada centímetro de incremento en la profundidad de la inseminación. No obstante, Cueto y Gibbons (1995) señalaron que en la mayoría de las ovejas rara vez se supera el centímetro de profundidad.

En las cabras, debido a su anatomía cervical, es posible realizar esta operación con mayor éxito que en las ovejas. Existen hembras (en especial de razas lecheras) en las que es posible la penetración del cuello uterino sorteando los primeros 2-3 anillos, pero con la precaución de no ejercer mucha presión, a fin de no lacerar la mucosa cervical (Aisen, 2004).

b) Inseminación laparoscópica

La endoscopía es una técnica que mediante un sistema óptico introducido en el interior del animal por punción del abdomen y una fibra flexible de vidrio para la propagación lumínica, permite realizar visualizaciones internas de órganos sin recurrir a la cirugía (Gibbons *et al.,* 1993). Cuando se realiza IA, esta técnica se denomina laparoscopía debido a que la observación se realiza atravesando la pared abdominal para la visualización de los órganos reproductivos internos. El acceso con la dosis de semen se realiza a través de un pequeño orificio que se efectúa con un trócar en proximidad de la glándula mamaria (Gibbons *et al.,* 1993), siendo necesaria la administración de anestesia local. La inseminación consiste en inyectar la mitad del semen en cada cuerno uterino, mediante una pipeta que dispone de una fina aguja en uno de sus extremos (Cueto y Gibbons, 1995).

Al evitarse la barrera cervical, la tasa de fertilización con semen congelado mejora significativamente. Esta técnica permite asimismo realizar un uso muy eficiente del semen. Debido a que la dosis de inseminación se deposita en la proximidad del ovario, basta un pequeño número de espermatozoides para preñar una hembra, permitiendo una difusión más amplia de genotipos valiosos (Dinatolo, 2011). No obstante, se trata de una técnica compleja, difícil de practicar a gran escala y que requiere equipos de costo elevado, o la contratación del servicio, limitando su uso a planteles de elite y a predios que reúnen determinadas condiciones de infraestructura (Olivera *et al.*, 2005).

2. Métodos de conservación del semen

2.1. Semen enfriado y refrigerado

En nuestro país, la IA en ovejas y cabras se realiza mayoritariamente con semen fresco y con concentraciones espermáticas que oscilan entre 60 y 100 millones de espermatozoides totales por dosis. La inseminación se realiza sobre el celo sincronizado o natural durante un ciclo estral, obteniendo en este último caso un porcentaje de preñez de alrededor del 70% (Naim, 2007). Sin embargo, el semen fresco debe ser empleado inmediatamente después de su colección y durante un

tiempo que media entre 40 a 60 minutos, debido a que su viabilidad se reduce rápidamente. Por lo tanto, si se desea utilizar el semen durante un período de tiempo mayor, será necesario emplear técnicas para su preservación (enfriado, refrigeración, congelación).

En la actualidad, se considera que la criopreservación de semen ovino a 15ºC resultaría adecuada para períodos breves (6-12 horas), en comparación con la criopreservación a 5ºC, que se adecuaría mejor para lapsos de tiempo más prolongados (12-24 horas) (Cueto y Gibbons, 2010).

La IA con semen refrigerado o enfriado se realiza generalmente por vía cervical (vaginal) (Figura 2A y 3A) mediante la deposición del semen en el cérvix, a nivel del orificio uterino externo. Esta vía es la forma más sencilla y menos costosa de difundir el uso del semen preservado en las majadas comerciales (Olivera et al., 2005).

Sin embargo, uno de los mayores problemas técnicos que presenta la IA con semen refrigerado o enfriado es que su poder fecundante es limitado en el tiempo, citándose valores medios de fertilidad de 40 y 55%, respectivamente (Cueto y Gibbons, 2010). Estudios realizados por Salamon y Maxwell (2000) reportaron una disminución de la fertilidad de entre 10 a 35% por cada 24 horas de refrigeración respecto al semen fresco. Según Salamon y Maxwell (2000); Dinatolo (2011), los espermatozoides preservados presentaron cambios funcionales y estructurales a nivel de sus membranas que determinaron una menor vida media. A su vez, Fernández Abella *et al.* (2006) reportaron una menor velocidad del transporte espermático del semen refrigerado respecto a la del semen fresco en el tracto genital.

Asimismo, tanto el empleo de semen refrigerado o enfriado requiere de un aumento considerable de la concentración espermática por dosis inseminante respecto al semen fresco (Figura 2 y 3). Esto es debido a los cambios que ocurren durante su criopreservación, que incluyen reducción de la motilidad y la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto. Esta disminución se debe principalmente a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Estos acontecimientos, junto con la reducción en el transporte y la supervivencia de los

espermatozoides en el tracto reproductivo femenino, disminuyen la fertilidad. (Salamon y Maxwell, 2000; Hollinshead *et al.*, 2004; Naim, 2007).

En el caso del caprino y a diferencia del ovino, también se utiliza la vía cervical en la inseminación con semen congelado, aunque con una dosis comparativamente alta (Figura 3A).

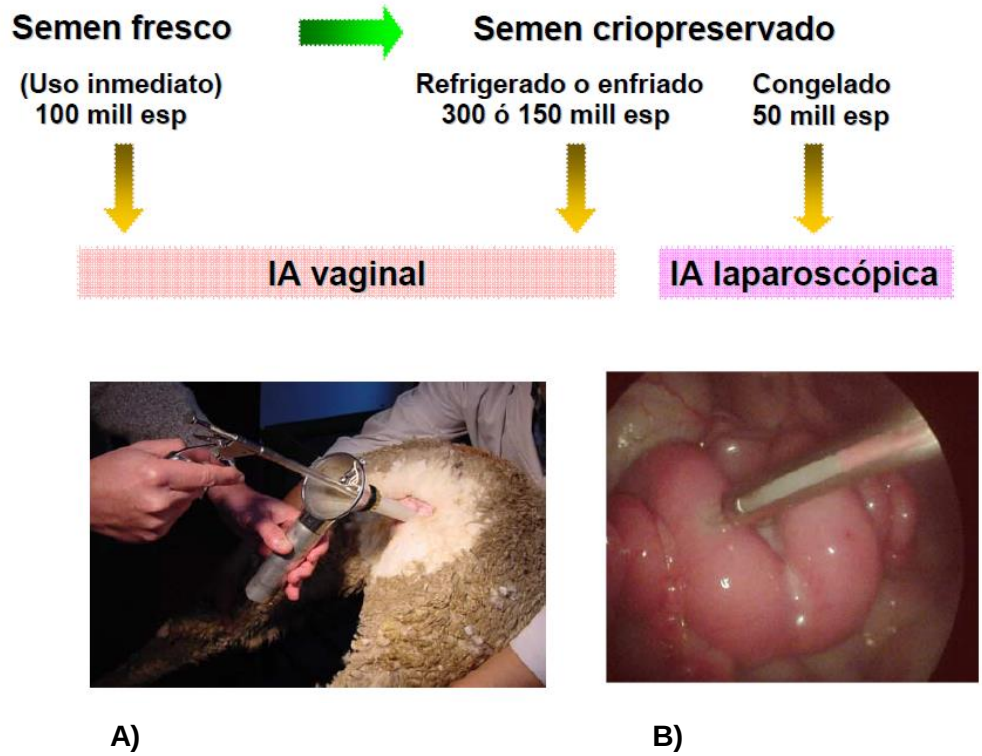

Figura 2: *Dosis de semen recomendada (millones de espermatozoides totales por dosis) según el lugar de deposición A) IA vía vaginal y B) IA vía laparoscópica y el método de conservación seminal en ovinos (Cueto y Gibbons, 2010).*

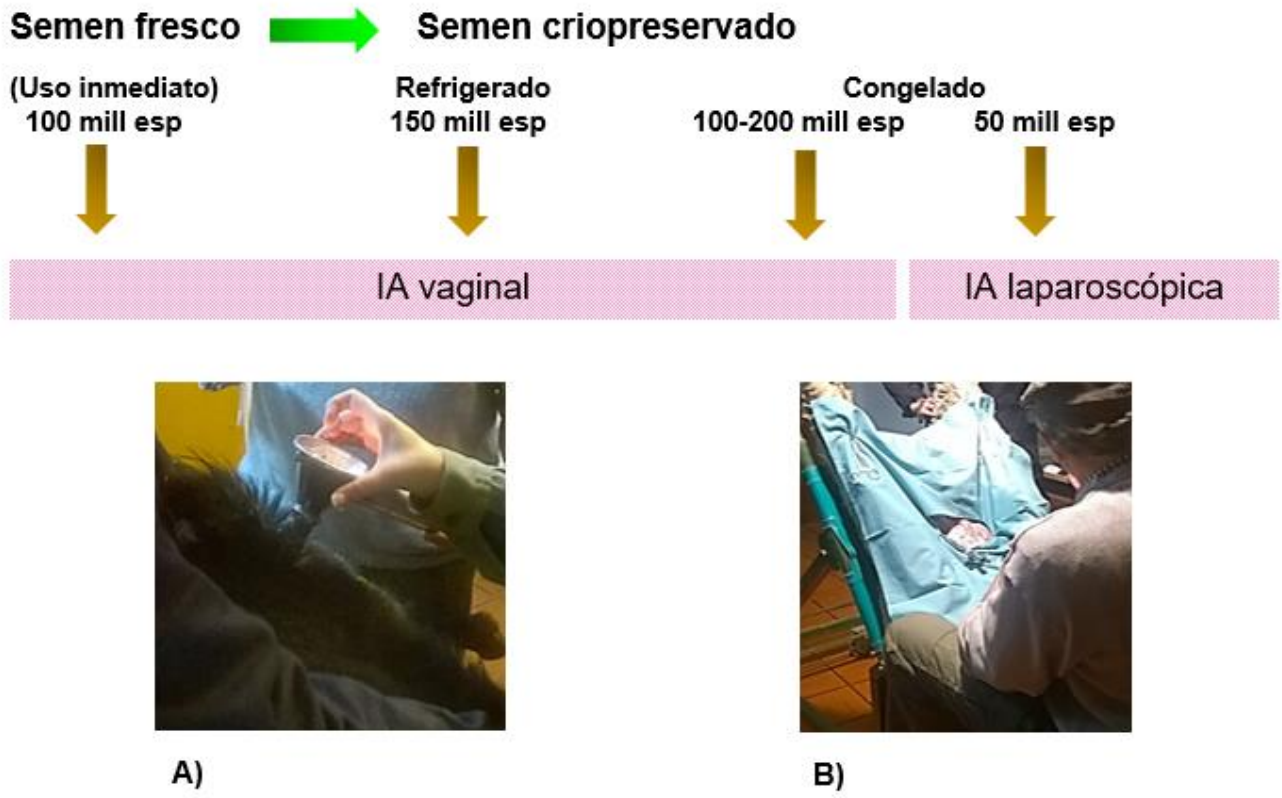

Figura 3: *Dosis de semen recomendada (millones de espermatozoides totales por dosis) según el lugar de deposición A) IA vía vaginal y B) IA vía laparoscópica y el método de conservación seminal en caprinos. (Elaboración propia a partir de datos y fotos tomadas durante el curso de Fisiología de la reproducción y biotecnologías reproductivas, EEA INTA Bariloche, 2015).*

La inseminación intrauterina bajo observación laparoscópica (Figura 2B y 3B) es la técnica que ha dado mejores resultados cuando se utiliza semen congelado. Sin embargo, Salamon y Maxwell (2000) encontraron una variación en el porcentaje de preñez de entre 39 y 62%. Esta variación, estaría supeditada a la gran cantidad de factores que determinan la eficiencia reproductiva de la IA, entre ellos se destacan los fármacos utilizados en la sincronización de estros, el estado nutricional de los animales y la variabilidad en la capacidad fecundante de cada partida seminal (Hafez, 1996; Salamon y Maxwell 2000; Dinatolo, 2011).

2.1.1. Eficiencia reproductiva en ovinos

Los espermatozoides para cumplir su función deben, después de ser eyaculados, experimentar una serie de cambios estructurales y bioquímicos al recorrer el aparato genital de la hembra que los habilitan para fertilizar el óvulo. Estos cambios se conocen con el nombre de capacitación espermática y van a desencadenar a su vez, otras dos modificaciones sobre el espermatozoide. En primer lugar, originan un aumento en el desplazamiento lateral del espermatozoide y el cambio desde un movimiento rectilíneo a uno curvilíneo denominado hiperactivación, para posteriormente producir una fusión entre la membrana plasmática y la acrosomal externa conocida como reacción acrosomal. Estos procesos son indispensables para que ocurra la fertilización (Garde López-Brea, 2002; Rodríguez-Almeida *et al.,* 2008; Dinatolo, 2011).

Cuando el semen diluido se conserva en refrigeración o en fresco por 4 horas o más, podrían ocurrir cambios en los espermatozoides, similares a los que tienen lugar durante la capacitación espermática (Rodríguez-Almeida *et al.,* 2008; Dinatolo, 2011). Estos cambios han sido descriptos para el semen criopreservado, y a este proceso se lo denomina criocapacitación. Si estos cambios son inducidos prematuramente, el uso del semen criopreservado en la IA puede reducir las tasas de concepción (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008).

Rodríguez-Almeida *et al.* (2008) cuantificaron la proporción de espermatozoides que sufrieron cambios relacionados con la capacitación espermática inducida a diferentes tiempos cuando el semen de carnero fue diluido en fresco, refrigerado o congelado, así como el grado de afección en la motilidad progresiva. Determinaron los porcentajes de motilidad progresiva (MP) y de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (patrón B) y reacción acrosomal (patrón RA) con diferentes tipo-tiempo de preservación utilizando el método de la clortetraciclina (CTC) modificado por Chamberland *et al.* (2001) (Figura 4).

Estos autores reportaron una reducción mayor de la MP en el semen fresco conservado por 3 y 6 horas respecto al semen refrigerado; en este último la

MP se mantuvo en los tiempos evaluados (Figura 4A). El semen refrigerado mantuvo su MP dentro de las 24 horas en valores similares al semen fresco a las 0 horas, debido a que el descenso de temperatura reduce la actividad metabólica y la motilidad, lo que aumenta la vida media de los espermatozoides. Si no se produjeron daños estructurales causados por shock térmico, la motilidad se restablece nuevamente al aumentar la temperatura seminal (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008).

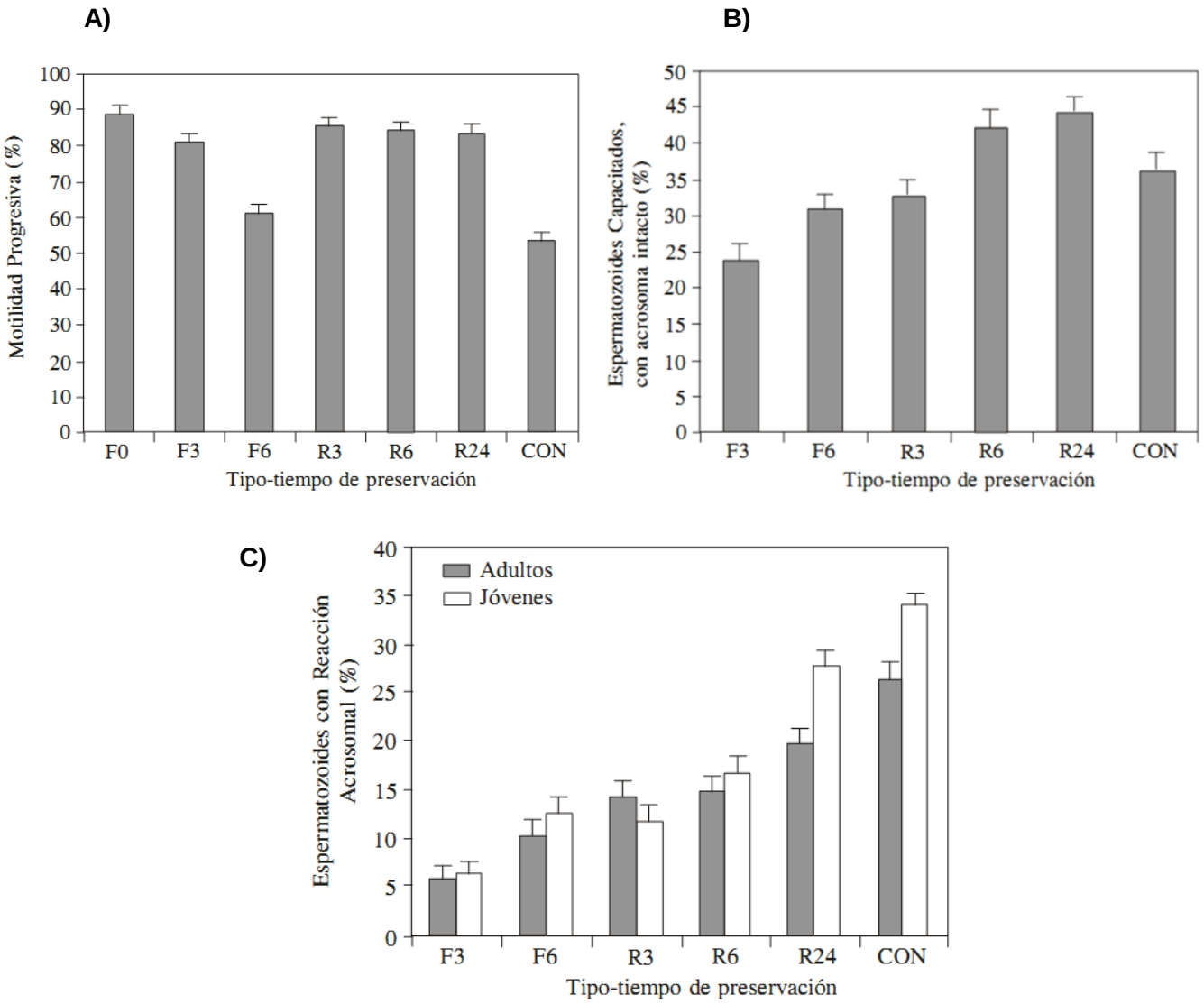

Figura 4: *Cambios relacionados con la capacitación espermática con diferentes niveles de tipo-tiempo de preservación en ovinos [diluido en fresco a 36 °C por 0 (F0), 3 (F3) y 6 horas (F6); refrigerado a 5 °C por 3 (R3), 6 (R6) y 24 horas (R24); congelado (CON)]* ***A)*** *Medias de los porcentajes de motilidad progresiva,* ***B)*** *Medias de los cuadrados mínimos para porcentajes de espermatozoides capacitados, con acrosoma intacto (Patrón B) y* ***C)*** *Medias de los cuadrados mínimos para porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal (patrón RA) en semen de carneros adultos y jóvenes (Rodríguez-Almeida et al., 2008).*

Al evaluar el porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (patrón B), el semen refrigerado a 5ºC evidenció un mayor porcentaje de acrosoma intacto en comparación con el semen fresco a 36ºC por 3 y 6 horas y con el semen congelado (Figura 4B). De acuerdo a estos autores, los resultados se deben a cambios en la membrana celular causados por las temperaturas de refrigeración y de congelación usadas para la criopreservación, estos cambios aumentarían los niveles intracelulares de Ca^{+2}, como ocurre en la capacitación espermática (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal (patrón RA), se observó un aumento en los espermatozoides con el patrón RA a medida que aumentó el tiempo de preservación, tanto para el semen fresco como refrigerado (Figura 4C). Asimismo observaron un mayor porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal en animales jóvenes (de alrededor de un año de edad) respecto a animales adultos, en el semen congelado respecto al semen refrigerado y en el semen refrigerado respecto al semen fresco. Según estos investigadores (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008), el efecto de la edad en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides se debe al grado de madurez de las glándulas sexuales accesorias en el macho. La concentración de proteínas en el plasma seminal aumentó significativamente de los 7 a los 13 meses de edad, mejorando la viabilidad y motilidad de los espermatozoides.

Los autores concluyen (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008) que un semen apto para la IA debe tener al menos 45 a 50% de espermatozoides intactos (la diferencia con respecto a la suma de espermatozoides con los patrones B y RA) lo cual no ocurre para el semen refrigerado 24 horas (R24) y el semen congelado (CON), indicando que el semen criopreservado de muchos carneros no sería apto para la IA. En este sentido, Salamon y Maxwell (2000) encontraron que el almacenamiento del semen refrigerado y el proceso de congelación-descongelación, puede avanzar en la maduración de las membranas espermáticas y aumentar la proporción de espermatozoides

capacitados y con reacción acrosomal. Los cambios en las membranas de los espermatozoides no afectan la motilidad, pero reducen la viabilidad y limitan la fertilidad; o pueden ser incapaces de fertilizar cuando se produce el envejecimiento de espermatozoides capacitados en el tracto reproductivo de la hembra luego de la IA.

En conclusión, el semen diluido se conserva bien en fresco las primeras 3 horas. La refrigeración a 5°C por 24 horas, al igual que la congelación, inducen niveles de capacitación espermática que disminuyen la fertilidad; siendo esto más crítico en carneros jóvenes que en adultos (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008).

Naim (2007) evaluó la eficiencia de preñez inseminando a tiempo fijo (IATF) con semen refrigerado, utilizando dos tiempos de preservación (12 y 24 horas) y dos dosis inseminantes (150 y 300 millones de espermatozoides). El mayor porcentaje de preñez se obtuvo con semen refrigerado durante 12 horas con respecto al de 24 horas. Por lo tanto, se demuestra que a medida que transcurren las horas disminuye la capacidad fecundante del semen refrigerado. A su vez, la eficiencia reproductiva fue mayor con una dosis de 300 millones en comparación con la de 150 millones de espermatozoides. Se concluye que es posible alcanzar una eficiencia de preñez de alrededor del 40% preservando el semen durante 12 horas y empleando una dosis de 300 millones de espermatozoides (Figura 5).

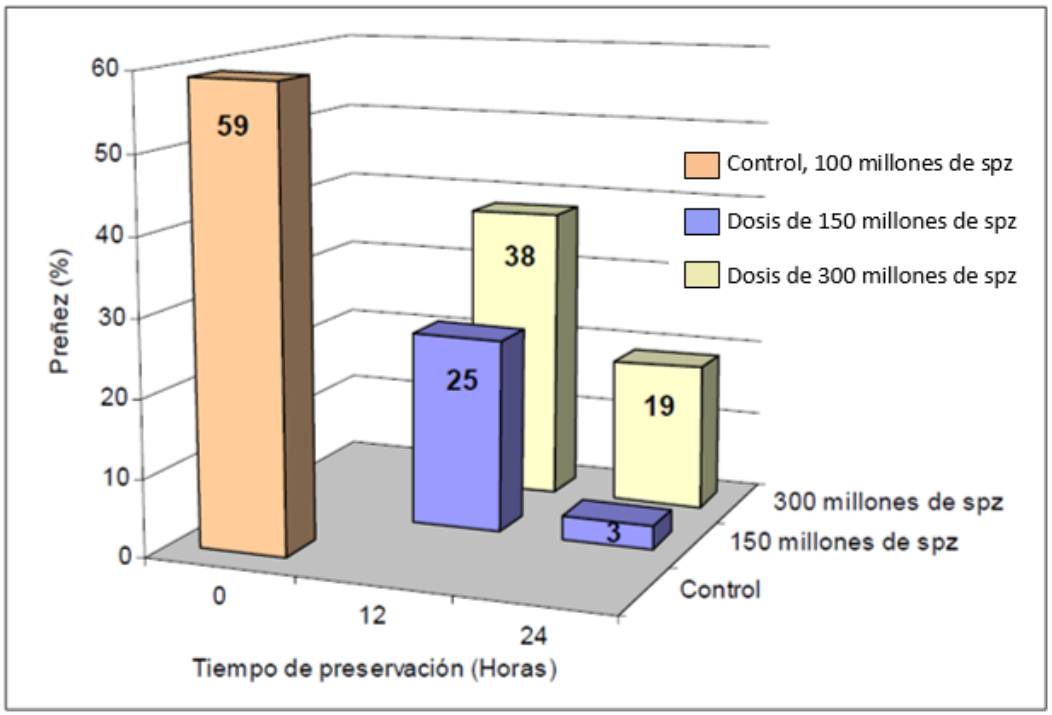

Figura 5: *Preñez obtenida en la IATF con semen refrigerado durante 12 y 24 horas y dosis de inseminación de 150 y 300 millones de espermatozoides (spz) en ovinos. El grupo control fue inseminado con semen fresco y una dosis de 100 millones de espermatozoides (Naim, 2007).*

Asimismo, Menchaca *et al.* (2005) afirmaron que es posible obtener tasas de preñez aceptables de entre 40 a 50% en ovejas inseminadas después de la detección del celo, con semen almacenado a 5°C durante 12 horas.

Cueto y Gibbons (2010) lograron obtener una fertilidad media del 55% con semen enfriado, mediante IATF vía vaginal (52-56 horas post finalización del tratamiento progestacional utilizando esponja intravaginal con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona y 200 UI de gonadotrofina coriónica equina), mientras que con semen refrigerado, obtuvieron una fertilidad media del 40%, con dosis de 150 y 300 millones de espermatozoides totales para semen enfriado y refrigerado, respectivamente (volumen de inseminación aproximado 0,12 cc para semen enfriado y 0,25 cc para semen refrigerado) (Figura 6).

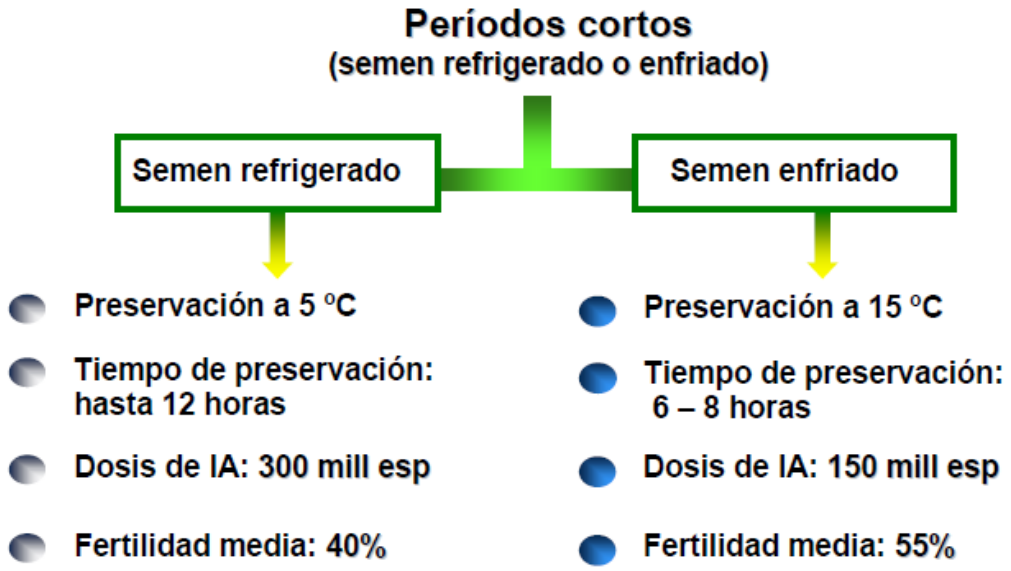

Figura 6: *Diferencias comparativas en la utilización del semen refrigerado y enfriado en ovinos (Cueto y Gibbons, 2010).*

En otro trabajo, Olivera *et al.* (2005) evaluaron la fertilidad mediante el uso de semen refrigerado a 5ºC utilizando dos diluyentes distintos, diluyente "TRIS" (en base a TRIS, fructosa, ácido cítrico, yema de huevo y antibióticos) y diluyente "Piedra Mora" (en base a Leche UAT descremada, yema de huevo, glicerol y antibióticos), con diferentes tiempos de preservación (24 y 48 horas). Se llevó a cabo IA cervical luego de la detección de estro natural, con una dosis inseminante de $120x10^6$ de espermatozoides. La fertilidad alcanzada con el diluyente "Piedra Mora" fue significativamente superior a las 0, 24 y 48 horas de preservación que la del diluyente "TRIS" (Figura 7). Finalmente, reportaron que las dosis seminales procesadas con el diluyente "Piedra Mora" podrían ser conservadas al menos hasta las 48 horas a 5ºC sin disminución significativa de la calidad seminal ni de la fertilidad en la IA cervical con celo natural.

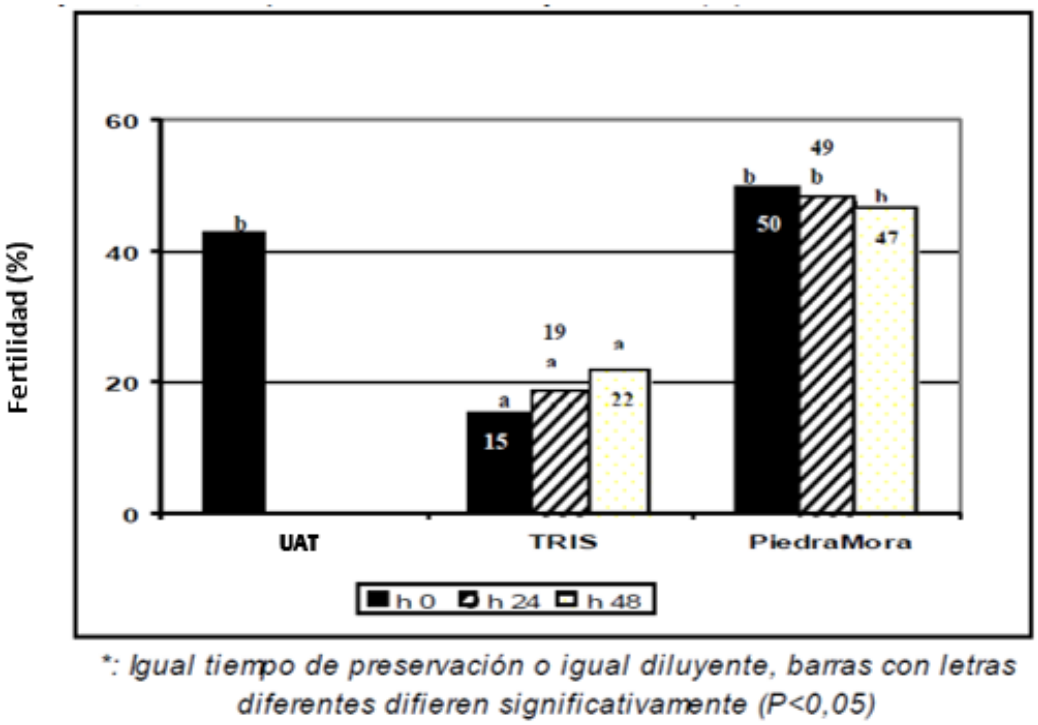

Figura 7: *Fertilidad obtenida mediante el uso de semen refrigerado a 5ºC utilizando dos diluyentes (TRIS y Piedra Mora), con diferentes tiempos de preservación (0, 24 y 48 horas) en ovinos. UAT, Diluyente control (preservación 0 horas, sin refrigerar) (Olivera et al., 2005).*

En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos mediante el uso de semen enfriado y refrigerado en la especie ovina, según diferentes autores y metodologías empleadas.

Tabla I: *Resultados obtenidos mediante IA vaginal según diferentes autores, en ovinos. (Elaboración propia a partir de publicaciones de distintos autores).*

Autor/es	T° de alm.	Tiempo de preservación	Concentración espermática	Diluyente	IA	Fertilidad
Naim (2007)	5°C	12 h	150 x 10^6	OviPro® (Biotay-Minitüb, Alemania)	IATF* (54- 56 h)	25%
		24 h				3%
		12 h	300 x 10^6			38%
		24 h				19%
Olivera *et al.* (2005)	5°C	24 h	120 x 10^6	TRIS (TRIS, fructosa, ác. cítrico, yema de huevo)	IA (celo natural)	19%
		48 h				22%
		24 h		"Piedra Mora" (Leche UHT descremada, yema de huevo, glicerol)		49%
		48 h				47%
Menchaca *et al*. (2005)	5°C	12 h	200 x 10^6	TRIS, glucosa, ác. cítrico, yema de huevo	IA (celo natural)	42,7%
		24 h				34,5%
Cueto y Gibbons (2010)	15°C	6-8 h	150 x 10^6	Leche descremada	IATF* (52-56 h)	55%
	5°C	12 h	300 x 10^6	Leche descremada, glucosa		40%
Hozbor *et al.* (2009)	18°C	8 h	---	Leche UHT descremada	IATF*	47%

**IATF: Inseminación a tiempo fijo*

2.1.2. Eficiencia reproductiva en caprinos

En referencia a los caprinos, los ensayos reportados son escasos y sólo mencionan el uso de semen refrigerado. En este sentido, estudios comparativos de diluyentes para semen refrigerado indican que se pueden obtener resultados relativamente estables utilizando leche descremada de vaca. Sin embargo, empleando diluyentes a base de yema de huevo, los resultados son variables; mostrando baja fertilidad en cabras inseminadas

debido a las altas concentraciones de lisolecitinas que afectan a los espermatozoides, por su efecto “espermicida”, dando lugar a la inmovilización y muerte de los mismos (Cortés-Gallego, 1998).

No obstante, Palomino *et al.* (2007) compararon dos diluyentes: uno en base a leche descremada ultrapasteurizada (diluyente A) y otro en base a TRIS-citrato-yema de huevo (diluyente B). Evaluaron el porcentaje de motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides vivos a través del tiempo (0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas), obteniendo mejores resultados con el diluyente en base a TRIS-citrato-yema de huevo (Tabla II), siempre y cuando la proporción de yema huevo no superase el 2%. Estos resultados podrían deberse a que el empleo de leche descremada como diluyente no siempre da resultados uniformes en la refrigeración seminal debido a la variabilidad en su composición (Palomino *et al.*, 2007).

Tabla II: *Motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos en caprinos con semen refrigerado a 5ºC según el tipo de dliluyente (Palomino et al., 2007).*

Tiempo (horas)	**Motilidad progresiva (%)**		**Espermatozoides vivos (%)**	
	Diluyente A	Diluyente B	Diluyente A	Diluyente B
0	82,2±6,2	87,2±4,4	91,7±2,5	93,9±2,2
12	75,0±4,3 a	82,2±5,7 b	85,6±3,0 a	88,3±2,5 b
24	70,6±3,0 a	77,8±6,2 b	81,7±5,0 a	85,0±3,5 a
48	67,2±2,6 a	75,6±5,8 b	80,6±3,9 a	83,9±2,2 b
72	61,7±2,5 a	71,1±3,3 b	75,6±3,9 a	80,0±3,5 b
96	60,0±1,7 a	68,3±2,5 b	71,1±3,3 a	77,2±3,6 b

Diluyente A: semen caprino con leche descremada; Diluyente B: semen caprino con tris-citrato-yema de huevo.
a, b: Diferencias significativas entre columnas (p<0,05).

Por otra parte, Vázquez *et al.* (2010) evaluaron la fertilidad y la prolificidad al parto mediante el uso de semen refrigerado a 5ºC mantenido hasta las 24 horas, comparando dos diluyentes: el diluyente Evans y Maxwell (1990), en base a TRIS, fructosa, ácido cítrico y yema de huevo, y el diluyente INRA 96 (IMV Technologies), que es un diluyente de semen equino elaborado a partir

de fracciones purificadas de leche. Los autores realizaron la IA, vía cervical, a las 44 horas de retiradas las esponjas intravaginales y utilizaron una dosis seminal de 300 x 10^6 espermatozoides. Si bien no obtuvieron diferencias significativas, observaron una mejor fertilidad con el diluyente INRA 96 (Tabla III). Al evaluar la prolificidad, no encontraron diferencias significativas (2,035 de prolificidad global).

Tabla III: *Fertilidad al parto en caprinos con semen refrigerado a 5ºC por 24 horas y dosis de inseminación de 300 millones de espermatozoides según el tipo de diluyente (Vázquez et al., 2010).*

Tipo de diluyente	n	Fertilidad
Evans y Maxwell	81	69,1%
INRA 96	74	77,0%
Global	155	72,9%

Martínez-Rojero *et al.* (2006) realizaron un estudio comparativo entre monta natural e IA por vía intrauterina mediante laparoscopía (24 horas después de detectar el estro y con una dosis de 100 millones de espermatozoides), con semen refrigerado (mantenido hasta las 48 horas después de su recolección) en cabras criollas, evaluando la tasa de fertilidad y el índice de prolificidad. La fertilidad obtenida para monta natural (82,5%) fue mayor a la registrada para la IA (67,5%), pero no encontraron diferencias significativas al considerar la prolificidad (1,20 y 1,18 respectivamente) (Tabla IV). Los autores atribuyeron estos resultados a que, al igual que lo ocurrido en la especie ovina, la refrigeración del semen induce la capacitación prematura de los espermatozoides, disminuyendo su capacidad fertilizante.

Tabla IV: *Tasa de fertilidad e índice de prolificidad en cabras criollas inseminadas intrauterinamente con semen refrigerado por 48 horas y dosis de inseminación de 100 millones de espermatozoides o servidas por monta natural 24 horas después de presentar estro (Martínez-Rojero et al., 2006).*

Tipo de servicio	n	Tasa de fertilidad*	Índice de prolificidad**
Inseminación	40	67,5% a	1,18 ± 0,39 a
Monta natural	41	82,5% b	1,20 ± 0,41 a

a,b: valores entre tipo de servicio indican diferencia estadística (p<0,05).
** Cabras paridas/cabras servidas.*
*** Número de crías por cabra parida.*

2.2. Semen congelado

Las técnicas de congelamiento del semen posibilitan aún más la multiplicación y difusión de genes (Cueto y Gibbons, 1995). Cuando el semen se congela y conserva en nitrógeno líquido (-196°C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides se detienen y permite que el material seminal pueda conservarse durante largos períodos. De esta forma, se puede disponer de material genético en cualquier época del año. Asimismo se amplía la utilización del germoplasma de los machos donantes, aún después de muertos (Aisen, 2004).

El empleo del semen congelado puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético a nivel mundial, al aumentar considerablemente el flujo de material genético de las cabañas hacia las majadas generales, así como al facilitar el transporte y comercialización de semen a nivel nacional e internacional. Mediante el congelamiento seminal, se evita el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el estrés, el riesgo físico y sanitario (Cueto y Gibbons, 1995).

Finalmente, esta técnica permite preservar el material genético de especies en riesgo de extinción y disponer de variabilidad genética de especies sujetas a un continuo proceso de mejoramiento de sus características productivas (Gibbons *et al*., 1993).

2.2.1. Inseminación cervical con semen congelado

Desde el desarrollo de la IA cervical con semen congelado, se ha intentado trasladar el éxito obtenido en bovinos a otras especies, tales como el ovino y el caprino. Sin embargo, los resultados de fertilidad han sido inconsistentes y extremadamente bajos (Garde López-Brea, 2002). En este sentido, Cueto y Gibbons (1995) reportaron en ovinos porcentajes de preñez, con semen congelado por vía cervical, que variaron entre el 20 y el 25%.

Salamon y Maxwell (2000) estudiaron las posibles causas de la baja fertilidad después de la inseminación cervical en ovinos y establecieron cuatro principales:

1) *El daño a los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación:* aunque una proporción relativamente alta (40-60%) de los espermatozoides preservaron su motilidad después del proceso de congelación- descongelación, sólo alrededor del 20 al 30% permanecieron biológicamente sin daños. Los cambios producidos en los espermatozoides podrían ser responsables de una disminución en su integridad funcional, la supervivencia *in vivo* y la capacidad de fertilización.

2) *El transporte, la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides en el tracto genital femenino:* estos autores encontraron una reducción en el transporte y viabilidad de los espermatozoides congelados-descongelados en el tracto genital de la hembra. Establecieron a las mismas como las principales causas de la baja fertilidad luego de la inseminación cervical.

3) *La capacitación:* el proceso de congelación-descongelación aumentó la proporción de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal. Si bien esto no afectó la motilidad, acortó la vida útil de las células espermáticas reduciendo o incapacitando la fertilización.

4) *La mortalidad embrionaria:* los espermatozoides dañados durante el proceso de congelación-descongelación y aquéllos que luego de la

inseminación envejecieron en el tracto femenino, pueden iniciar embriones que no son viables o perecerán en una etapa temprana de la gestación.

Estos mismos autores, analizaron también los métodos y los intentos para mejorar la fertilidad después de la inseminación cervical y destacaron cuatro:

1) *El aumento de la concentración de espermatozoides:* con el fin de depositar un alto número de espermatozoides en la inseminación. Esto incrementó el número de espermatozoides en todo el tracto reproductivo hasta el oviducto y mejoró la fertilidad. Sin embargo, la eficiencia fue baja, ya que sólo unas pocas ovejas podían ser inseminadas por eyaculado.

2) *El uso de relaxina, oxitocina y prostaglandinas:* estas hormonas se utilizaron con dos objetivos posibles, la relajación del cuello uterino para la deposición profunda del semen, y/o para aumentar la contractilidad del tracto genital mejorando el transporte de los espermatozoides. De acuerdo a estos autores, el uso de las mismas no logró ningún efecto beneficioso.

3) *Doble inseminación:* es un método utilizado para aumentar la fertilidad. La magnitud de la respuesta puede depender de la concentración de espermatozoides y del momento de la inseminación en relación a la etapa del estro. Según estos autores fue poca la ventaja que se logró con la segunda inseminación, cuando la primera se había realizado aproximadamente a la mitad del estro. Al comparar la inseminación simple y doble no encontraron diferencias significativas en cuanto a la fertilidad. Asimismo determinaron que el número de espermatozoides móviles inseminados era comparativamente más importante que la simple o doble inseminación.

4) *Profundidad de la inseminación:* se observó un incremento de la fertilidad a medida que se logró una mayor profundidad en la inseminación con semen ovino introducido a través del cuello uterino (Figura 8). Asimismo, de acuerdo a estos autores, la inseminación cervical profunda permitió una disminución en el número de espermatozoides móviles a una dosis de 20 o 40 millones, que después de una sola inseminación alcanzó una fertilidad de 50 y 53% respectivamente, en comparación con el 51% para

la inseminación control con 80 a 100 millones de espermatozoides móviles.

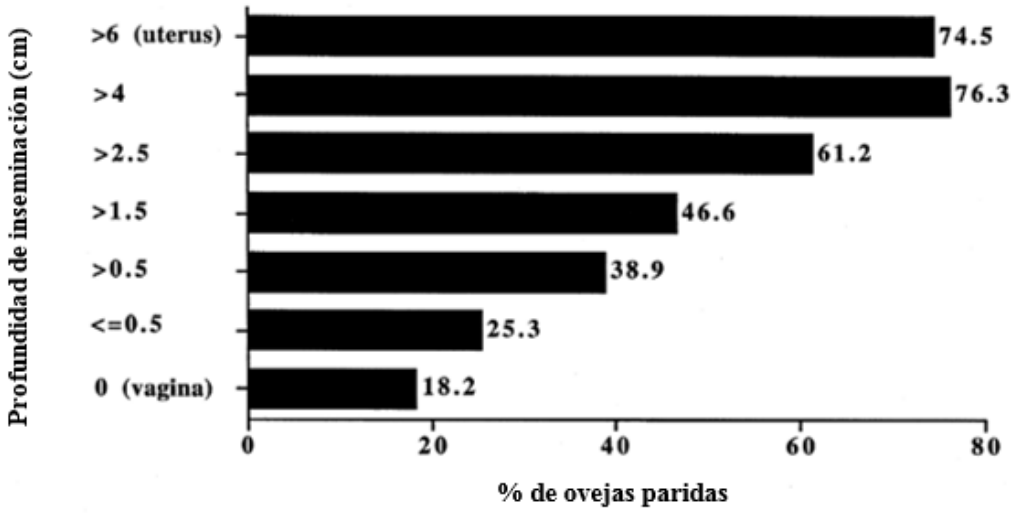

Figura 8: *Efecto de la profundidad de inseminación (cm) sobre la fertilidad del semen ovino congelado-descongelado introducido a través del cuello uterino* (promedios ponderados de 26 publicaciones; 9.716 ovejas) *(Salamon y Maxwell, 2000).*

En la especie caprina, a diferencia de la ovina, es posible realizar la IA cervical con semen congelado, alcanzando tasas de fertilidad de alrededor del 50%. Esto es así debido a una mayor permeabilidad del cérvix caprino a la pipeta de inseminación (Gibbons *et al*., 1993).

Se han obtenido tasas de fertilidad de alrededor del 50% en la IA cervical en cabras de la raza Angora, con una dosis de inseminación de 200 millones de espermatozoides totales (Gibbons *et al.*, 1993). La dosis de IA puede ser reducida en razas de mayor tamaño tales como las razas lecheras o la Criolla Neuquina, a un valor de referencia de 100 millones de espermatozoides (Aisen, 2004). En razas lecheras (Alpina y Saanen), Baril *et al.* (1998) describen una fertilidad superior al 60% mediante la IA cervical con semen congelado a las 43-45 horas post retiro de la esponja intravaginal (IATF), con 100 millones de espermatozoides totales.

2.2.2. Inseminación intrauterina con semen congelado

La inseminación mediante laparoscopía es utilizada ampliamente en la especie ovina (Figura 9), en la cual los porcentajes de preñez con semen congelado por vía cervical son del 20-25%, debido a la dificultad que presenta el cérvix para ser traspuesto con la pipeta de inseminación (Cueto y Gibbons, 1995).

En el caprino está siendo utilizada con la doble finalidad de elevar el porcentaje de preñez respecto a la IA por vía vaginal y de reducir el número de espermatozoides por dosis de inseminación (Gibbons *et al.*, 1993).

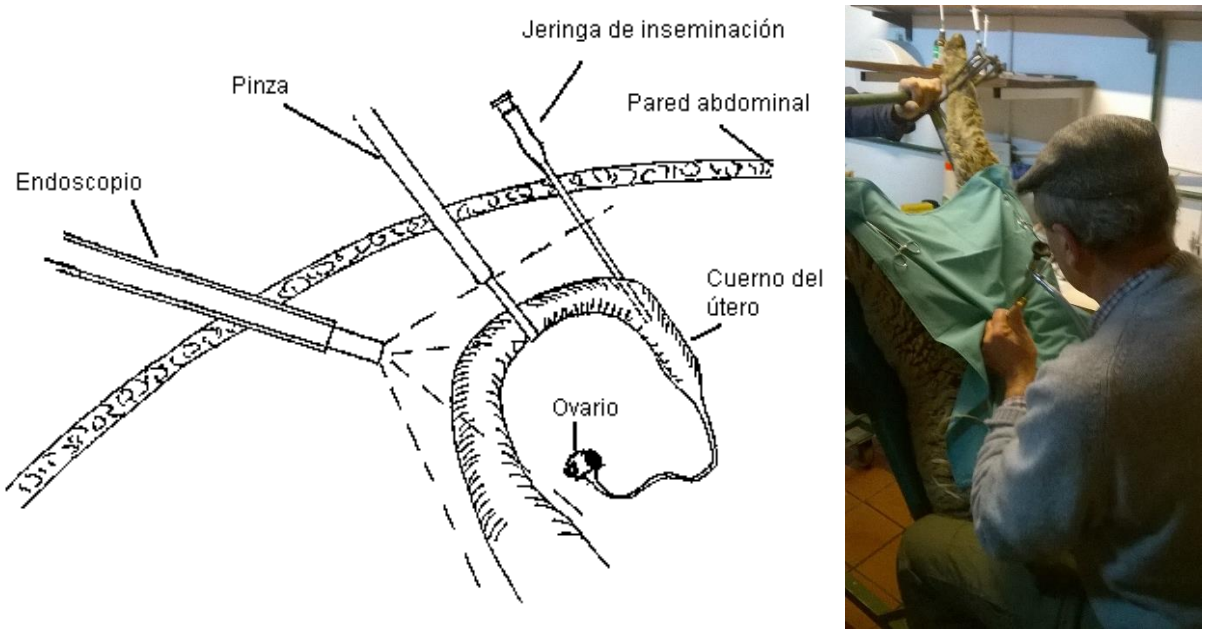

Figura 9: *Inseminación artificial por laparoscopía (der. Gibbons et al., 1993; izq. Foto tomada durante las prácticas del curso de Fisiología de la reproducción y biotecnologías reproductivas, EEA INTA Bariloche, 2015).*

A continuación, se presentan valores de eficiencia reproductiva de referencia para distintas alternativas de IA con semen congelado en ovinos de la raza Merino con una dosis de 50 millones de espermatozoides (Tabla V).

Tabla V: *Eficiencia reproductiva para distintas alternativas de IA con semen congelado en ovinos de la raza Merino. Valores de referencia (Cueto y Gibbons, 1995).*

		TASAS DE PREÑEZ (%)		
			IA post detección de estros	
SEMEN	**VIA**	**IATF***	Estro sincronizado	Estro natural
Congelado	Laparoscópica	50	65	65

**IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo (60±2 horas post retiro de la esponja intravaginal).*

Asimismo se presentan valores de eficiencia reproductiva de referencia en IA con detección de estros y semen congelado en caprinos de la raza Angora (Tabla VI) (Gibbons *et al*., 1993).

Tabla VI: *Eficiencia reproductiva para distintas alternativas de IA con semen congelado en caprinos de la raza Angora. Valores de referencia (Gibbons et al., 1993).*

SEMEN	VIA	DOSIS	PREÑEZ
CONGELADO	Cervical	200 millones	50%
	Laparoscópica	50 millones	65%

DISCUSION GENERAL

Actualmente, la información existente sobre la IA con semen refrigerado y enfriado en ovinos y caprinos es escasa, especialmente en referencia a la especie caprina. Al analizar las publicaciones disponibles, se encuentra una gran variabilidad en los resultados descriptos, posiblemente relacionada a las distintas metodologías empleadas: múltiples diluyentes, concentración espermática variable, vías de inseminación utilizadas, diferentes tiempos de preservación.

Al evaluar la fertilidad con semen refrigerado mediante la IATF cervical en la especie ovina, se observa que las tasas más altas se obtienen con tiempos de preservación de 12 horas y dosis seminales de 300 millones de espermatozoides. Estos valores se modifican al emplearse la IA sobre celo natural, con tiempos de conservación de 48 horas y dosis de inseminación de 120 millones de espermatozoides, aportando evidencia a la mayor fertilidad de los celos naturales respecto a los celos sincronizados hormonalmente, especialmente en la IA mediante la vía cervical.

En el caso del semen enfriado, los valores de fertilidad oscilan entre el 50 y 55%, con tiempos de preservación de 6 a 8 horas, y una dosis seminal de 150 millones.

En general, para obtener un índice de fertilidad de entre un 40 a 50% en ovinos usando semen refrigerado, el tiempo de preservación no debería superar las 12 horas, siendo necesario el empleo de una alta concentración espermática. En cambio, si consideramos el uso de semen enfriado, se podrían lograr incluso mayores tasas de fertilidad (60-65%), utilizando una dosis seminal comparativamente menor, con un tiempo de preservación no mayor a las 8 horas.

Si consideramos el empleo del semen congelado ovino, es posible alcanzar tasas de fertilidad del 50 al 65% mediante la IA laparoscópica, con una dosis seminal de 50 millones totales, en tanto que su tiempo de conservación es ilimitado. Se observa que la fertilidad alcanzada luego de la detección de estros (65%) es mayor en comparación a la obtenida mediante la IATF (50%), lo que indicaría la importancia del momento de deposición del semen congelado en relación al momento de ocurrencia de la ovulación. Esta diferencia podría deberse a la reducida viabilidad

del semen congelado, que comienza a declinar a partir de las 6 a 12 horas post inseminación (Walker *et al.* 1989). En tanto que no se observan diferencias en la fertilidad de los celos naturales vs los celos sincronizados, sugiriéndose que la alteración del transporte espermático debido al tratamiento hormonal no afectaría la tasa de preñez, probablemente debido a la deposición intrauterina de la dosis seminal.

En el caprino, el uso del semen refrigerado ha sido muy limitado, en tanto que no se encontraron referencias en el empleo del semen enfriado. Una posible explicación podría ser la factibilidad que se presenta en esta especie para realizar la IA con semen congelado mediante la vía cervical. Se describen tasas de fertilidad del 70%, utilizando una dosis de semen refrigerado de 100 a 300 millones totales y un tiempo de preservación de 24 a 48 horas. La fertilidad obtenida mediante el uso del semen congelado, varía entre el 50 y 65%, con dosis de inseminación de 100-200 y 50 millones, para la IA cervical y laparoscópica, respectivamente.

CONCLUSIONES

El empleo de semen preservado en ovinos y caprinos es una práctica económicamente viable, de fácil implementación, con resultados aceptables y prometedores. Mediante la adecuación de los protocolos de sincronización de estros e IA a los diferentes sistemas de producción, se posibilita el empleo eficiente de las técnicas reproductivas, alcanzando tasas de preñez de alrededor del 50% mediante la utilización de semen conservado.

El uso del semen refrigerado y enfriado en ovinos permite la conservación seminal y su posterior utilización mediante la IA cervical, a diferencia de lo que ocurre con el semen congelado, que únicamente puede utilizarse mediante la vía intrauterina.

Sin embargo, en la especie caprina, es posible realizar la IA con semen congelado mediante vía cervical profunda. Razón por la cual, la utilización de semen refrigerado y enfriado podría estar más limitada.

La aplicación práctica del uso del semen enfriado o refrigerado toma mayor interés al considerar la alta demanda de material genético, el bajo costo del equipamiento requerido, la practicidad en el procedimiento de manejo del semen y en su factibilidad de implementación a campo. En su conjunto, estas ventajas favorecerían el uso del semen preservado por cortos períodos de tiempo en programas de mejoramiento genético en poblaciones de rumiantes menores.

Futuras investigaciones permitirán obtener un protocolo que se adecúe para cada situación, promoviendo la difusión de material genético superior, a costo reducido, hacia medianos y pequeños productores.

BIBLIOGRAFIA

- Aisen, E. G. 2004. Reproducción ovina y caprina. Inter-médica. Argentina. 206 pp.

- Álvarez, M.; Anel, L.; Anel, E.; Boixo, J. C.; Chamorro, C. y Domínguez, J. C. 1996. Inseminación artificial ovina (vía vaginal): variaciones de fertilidad en función del lugar de aplicación de la dosis seminal. *Actas de las XXI Jornadas de la S.E.O.C,* p. 395-399.

- Baril, G.; Freitas, V.J.F. y Saumande, J. 1998. Les traitements progestagenes d´induction/synchronisation de l´oestrus chez la chevre: le point sur les recherches recentes. *Revue Med .Ve*t. 149: 359-366.

- Chamberland, A.; Fournier, V.; Tardif, S.; Sirard, M. A.; Sullivan, R. y Bailey, J. L. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55: 823-835.

- Cortés-Gallego, S. 1998. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. *Universidad Complutense de Madrid*.

- Cueto, M.; García Vinent, J.; Gibbons, A.; Wolff, M. y Arrigo, J. 1993. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche N° 200, p. 14.

- Cueto, M. y Gibbons, A. 1995. Manual de inseminación artificial en la especie ovina. Com. Técnica Nº 281, Serie Prod. Anim. INTA-EEA-Bariloche, p. 17.

- Cueto, M y Gibbons, A. 2010. Conservación seminal e inseminación artificial en ovinos. *Actualización en Producción Ovina 2010*, p. 61.

- Delgado Bermejo, J. V.; Barba Capote, C. y Cabello Robles, A. 2014. Técnicas reproductivas en ganadería. Guía docente del curso. *Universidad de Córdoba*.

- Dinatolo, E. F. 2011. Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino refrigerado. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias. *Universidad Católica Argentina*.

- Eppleston, J. 1992. Studies on the fertility for frozen-thawed ram semen. Tesis Doctoral. *Universidad de Nueva Gales del Sur*.

- Evans, G. y Maxwell, W.M.C. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia. Zaragoza.

- Fernández Abella, D.; Guérin, Y.; Sterla, S., Irabuena, O. y Dacheux, J. L. 2006. Efecto de dos diluyentes para conservación de semen refrigerado y del momento de inseminación sobre la fecundidad ovina. *Producción Ovina*, Vol. 18, p. 41-47.

- Garde López-Brea, J. 2002. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. *Universidad Complutense de Madrid*.

- Gibbons, A.; Cueto, M. y Wolff, M. 1993. Manual de inseminación artificial en la especie caprina. Com. Técnica Nº 235, *Serie Prod. Anim.* INTA-EEA-Bariloche, p. 14.

- Hafez, E. S. E. 1996. Reproducción e Inseminación artificial en animales. Interamericana Mc Graw – Hill. México. 542 pp.

- Hernández Ballesteros, J. A.; Navarrete Méndez, R.; Benítez Meza, J. A.; Moreno Flores, L. A.; Gómez Gurrola, A. y Bernal Partida, M. A. 2015. Fertilidad con el uso de inseminación artificial en ovejas. *Entorno ganadero 71*, BM Editores.

- Hollinshead, F. K.; O'Brien, J. K.; Gillan, L.; Meyers, M.; Maxwell, W. M. C. y Evans, G. 2004. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 62: 587-605.

- Hozbor, F.; Manes J.; Ríos, G. y Sánchez, E. 2009. Reproducción: inseminación artificial de ovinos. *Visión rural*, Vol. 16, N° 80.

- Leboeuf, B.; Restall, B. y Salamon, S. 2006. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62 p. 113-141.

- Martínez-Rojero, R. D.; Hernández-Ignacio, J.; Hernández-Hernández, H.; Michel-Aceves A. C. y Valencia-Méndez, J. 2006. Inseminación artificial intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado. *Agrociencia*, Vol. 40, N° 1, p. 71-76.

- Menchaca, A.; Pinczak, A. y Queirolo, D. 2005. Storage of ram semen at 5 C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim. Reprod.*, Vol. 2, N° 3, p. 195-198.

- Naim, P. 2007. Efecto del tiempo de criopreservación y concentración espermática en la inseminación artificial con semen refrigerado de carnero. Tesis de Grado. *Universidad Nacional del Comahue*. Centro Regional Universitario Bariloche. INTA

- Olivera, J.; Gil, J.; Araujo, A.; Gamarra, J.; Teixeira, V. y Fierro, S. 2005. Preservación seminal para la IA cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: semen refrigerado (24 y 48 horas). *INIA Serie Actividades de Difusión*.

- Palacín, I.; Yániz, J. L.; Fantova, E.; Blasco, M. E.; Quintín-Casorrán, F. J.; Sevilla-Mur, E. y Santolaria, P. (2012). Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep. *Animal reproduction science*, *132* (3), 139-144.

- Palomino, J. M.; Cervantes, M.; Rodríguez, A.; Cisneros, F. y Huanca, W. 2007. Efecto de dos dilutores y tiempos de refrigeración sobre la motilidad individual de semen refrigerado de caprinos. APPA- ALPA. Cusco, Perú.

- Quintero Moreno, A. A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. *Universidad Autónoma de Barcelona*. 164 pp.

- Rodríguez-Almeida, F. A.; Ávila Cota, C. O.; Anchondo Garay, A.; Sánchez-Ramírez, B. y Jiménez Castro, J.A. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*, Vol. 42, N° 4, p. 399-406.

- Salamon, S. y Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62 p. 77-111.

- Sepúlveda Becker, N. 2012. Inseminación artificial en ovinos. XVI Congreso Venezolano de Producción Animal, *VI Congreso Internacional de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo.

- Vázquez, J. M.; Mazariegos, V.; Salvador, S.; Garrido, C. y De la Fuente, L. F. 2010. El diluyente INRA96 en la inseminación artificial caprina. *XXXV Congreso de la SEOC*. Valladolid.

- Vidament, M.; Dupere, A. M.; Julienne, P.; Evain, A.; Noue P. y Palmer, E. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48: 907- 917.

- Walker, S.; Smith, D.; Frensham, A.; Ashman, R. y Seamark, R. 1989. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the collection of embryos of sheep. *Theriogenology* 31: 741-752.

- White, L. G. y Darin-Bennett, A. 1976. The lipids of sperm in relation to cold shock. *Proc. 8th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Krakow, pp. 951-954.