

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES DILUYENTES PARA SEMEN OVINO, FRESCO
Y REFRIGERADO**

Por

María Agustina CASH DURÁN

Santiago CASTAGNA DU PRÉ

Diego Andrés TEXEIRA SILVA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias

Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

Montevideo

Uruguay

2015

PAGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Danilo Fila

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Fernando Perdigón

Tercer Miembro:

Dr. Rafael Aragunde

Cuarto Miembro (Co-tutor):

Dr. Daniel Cavestany

Fecha:

13 de Marzo de 2015

Autores:

María Agustina Cash Durán

Santiago Castagna Du Pré

Diego Andrés Texeira Silva

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer en primer lugar a nuestro tutor Fernando Perdigón y co-tutor Daniel Cavestany por todo el tiempo que nos han dedicado. También al Dr. Eduardo Texeira, quien nos ayudó en el ensayo y nos proporcionó material para poder realizarlo.

Y por último a nuestros familiares, amigos y aquellas nuevas amistades que hicimos en estos años de carrera, por su acompañamiento en ella.

TABLA DE CONTENIDOS

TÍTULO	PÁGINA
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN (SUMMARY)	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
Anatomía y fisiología del macho	10
Escroto testículos y epidídimos	10
Glándulas anexas	11
Pene y prepucio	12
Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal	12
Examen andrológico	13
Examen objetivo general	14
Examen objetivo particular	14
Colecta de semen	15
Vagina artificial	16
Electroejaculación	17
Semen	18
Definición y composición	18
Metabolismo espermático	20
Espermiograma	20
Análisis macroscópicos	21
Análisis microscópicos	22
Estrategias de preservación	24
Semen fresco	25
Semen refrigerado	25
Semen congelado	26
Diluyentes	26
Principios y componentes básicos	27
Diluyentes naturales	29

Diluyentes sintéticos	30
Agentes protectores de membrana	31
Principales causas de la disminución de la fertilidad del semen almacenado líquido	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	43
CONSIDERACIONES FINALES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Título	Página
Cuadro 1. Escala de clasificación de las características de motilidad seminal	23
Figura 1. Rutina de extracciones	35
Figura 2. Porcentaje de motilidad a las 0, 4, 12, 24 horas según diluyente	38
Cuadro 2. Puntos de vigor a las 0, 4, 12, 24 horas según diluyente.	39
Figura 3. Porcentaje de motilidad progresiva en los distintos momentos de evaluación según las distintas razas.	40
Cuadro 3. Puntos de vigor según raza en un período de 0, 4, 12, 24 horas.	41
Figura 4. Porcentaje de motilidad progresiva en los distintos momentos de evaluación según los distintos métodos de colección.	41
Cuadro 4. Puntos de vigor en el período estudiado según método de colecta.	42

RESUMEN

Se evaluó la eficacia de tres diluyentes, leche UHT entera, UHT descremada y Verde® -IMV, Francia- tras ser utilizados como extensores de semen de carnero. Se evaluaron dos razas (Corriedale y Milschaff) y dos métodos de colección (vagina artificial y electroeyaculación) con el fin de verificar si estas variables influyen o no en el desempeño de dichos diluyentes. Se observaron los parámetros motilidad individual de los espermatozoides y vigor (tipo de movimiento) al tiempo 0, a las 4, 12, y 24 horas de la extracción luego de ser refrigerado a 5°C. Logrando concluir que entre leches no existen diferencias significativas y que el Verde® -IMV, Francia- obtiene una mejor preservación en el tiempo. Tanto las razas como los métodos de colecta no afectan el resultado de los diluyentes.

SUMMARY

The efficacy of three extenders, UHT whole milk, UHT skim milk and Verde® -IMV, France- were evaluated as ram semen extenders. Different breeds (Corriedale and Milschaff) and different methods of collection (artificial vagina and electroejaculation) were studied in order to verify whether these variables influence or not in the performance of these diluents. Individual motility of spermatozoa and vigor (type of movement) were observed at time 0, 4, 12, and 24 hours of extraction after being refrigerated at 5 °C. Concluding there is no significant differences between different type of milks and that Verde® - IMV, France - achieve better preservation in time. Breeds and collection methods do not affect the diluents result.

INTRODUCCIÓN

Uruguay es uno de los principales países productores de ovinos, teniendo una larga y rica historia en el país. Se caracteriza por tener desarrollado un sistema pastoril extensivo a cielo abierto y en conjunto con vacunos, desarrollado actualmente sobre suelos mayormente basálticos comprendiendo los departamentos de Artigas, Salto, Tacuarembó, Paysandú, Cerro Largo y Durazno (MGAP-DIEA, 2012).

En nuestro país, se ha notado un claro descenso del stock ovino desde la década del 90 hasta la actualidad, como consecuencia de la introducción y crecimiento de nuevos rubros, existiendo según la última declaración jurada un total de 8,7 millones de ovinos (MGAP-DICOSE, 2012). De todas formas, se ha notado un aumento del 16% del stock con respecto al ejercicio pasado, ocupando aproximadamente 2 millones de hectáreas (15% de la superficie del país) (SUL, 2014).

Durante el período mayo 2013 - abril 2014, ingresaron a Uruguay un total de 391,1 millones de dólares por el concepto de exportaciones de productos que componen el rubro ovino (lanas y sus productos, carne ovina, pieles, ovinos en pie, grasa lanar y lanolina). Esto representa un aumento del 7,6% respecto al período anterior según datos proporcionados al SUL por la Dirección Nacional de Aduanas. El 67,9% de dichas ganancias proviene de la lana y sus productos mientras que el 26,7% de la carne. En este período, Uruguay exportó un total de 52,4 millones de kilos de lana equivalente base sucia (lana sucia, lavada y peinada), 13,9% más que el período anterior. En cuanto a la carne, se exportaron 22 millones de kilos de carne, representando un aumento de 32,1% (SUL, 2014).

Los productores, por lo general, están interesados en mejorar las producciones de sus majadas y para ello seleccionan los animales de calidad superior. Como un macho produce más crías que una hembra, se hace especial hincapié en la selección de aquellos (Salamon y col., 1990). Con el afán de lograr este objetivo, surgieron herramientas tecnológicas como la inseminación artificial (IA).

En ovinos los primeros trabajos registrados de IA datan del 1907 por Ivanov en Moscú, quién inseminó ovejas y vacas, siendo el verdadero precursor de esta técnica en las especies domésticas (Aisen, 2004). En cuanto a nuestro país, en 1938 fueron presentados por primera vez en la Exposición rural del prado, dos carneros Lincoln, ambos productos de IA (Durán del Campo, 1993).

A partir de esto, los doctores J. Riet, L. Echenique y D Jaunsolo realizaron las primeras investigaciones sobre la técnica. Son sin embargo, A. Fernández Goyechea y el Dr. J. C. Gutiérrez Fabre los primeros en trasladar la inseminación del laboratorio al campo. A partir del año 1942 comienza a desarrollarse vigorosamente la IA (Durán del Campo, 1993).

La inseminación artificial es un método en el cual el semen es obtenido del macho y se introduce en el tracto genital femenino mediante instrumentos adecuados, evitando el contacto entre animales. El uso de esta técnica permite aumentar el número de servicios por macho (Salamon y col., 1990). Esto es posible mediante un adecuado fraccionamiento del semen colectado. Con esto se logra un mayor aprovechamiento del macho superior, acelerando el proceso de mejora genética ya que logra cubrir mayor número de hembras que en la monta natural. La preservación y dilución del semen favorece aún más la eficiencia de la técnica y la optimización de los machos (Gil y col., 2005).

Los distintos tipos de preservación pueden conservar al semen por períodos cortos (semen refrigerado) o largos (semen congelado). La dilución y refrigeración no sólo permite optimizar el eyaculado, sino que también trasladar el material de un establecimiento a otro sin la necesidad de trasladar al animal con todo lo que esto implica. La preservación de semen en forma líquida es una manera relativamente económica para lograr ese objetivo, pero a medida que el tiempo de preservación aumenta, la viabilidad (motilidad individual) disminuye, debido a que los espermatozoides experimentan cambios que determinan una menor longevidad (Gil y col., 2005).

El mayor avance en diluyentes de semen surgió con el descubrimiento de la yema de huevo (1939) (Cavestany, 1994). El diluyente más utilizado para semen fresco y refrigerado es la leche descremada ultrapasteurizada (UHT). Existen también diluyentes comerciales que agregan a las funciones de protección del equilibrio ácido-base y nutrición del espermatozoide, la presencia de antibióticos que inhiben la proliferación de gérmenes que modifican la composición del medio.

Debido al costo y a la dificultad de obtener diluyentes comerciales, es que se buscaron opciones más accesibles como el caso de la leche descremada ultrapasteurizada (UHT). La importancia de este trabajo estriba en que es una técnica ampliamente difundida en el país y al comparar distintos diluyentes, se verá si existen diferencias entre ellos en cuanto a la posibilidad de preservar el semen sin perder su capacidad fecundante por un mayor período de tiempo, evaluando en pruebas *in vitro* diferentes parámetros seminales correlacionados

positivamente con la fertilidad. Esto tendrá relevancia práctica a la hora de llevar a cabo un programa de inseminación, ya que permitirá saber cuál diluyente logra los mejores resultados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Anatomía y fisiología del macho

El aparato reproductor del macho es el encargado de la producción de los gametos, así como de su conducción a los genitales de la hembra. Está compuesto por los testículos encargados de la producción de espermatozoides y la hormona masculina testosterona, los ductos excretores y epidídimos a quienes les está encomendada la tarea de conducir y madurar los gametos, las glándulas anexas encargadas de agregar importantes elementos al eyaculado de modo de diluir y dar volumen al material seminal y finalmente el pene y uretra que deberán conducir esa masa seminal hasta los genitales de la hembra (Durán del Campo, 1993).

Escroto, testículos y epidídimos:

Las gónadas descienden durante la vida fetal a un divertículo del abdomen llamado escroto que en esta especie es pendular y se encuentran suspendidas por el cordón testicular. Las partes del escroto empezando desde el exterior son la piel con lana provista de glándulas sudoríparas y sebáceas. Adherido a la cara interna de la piel está el dartos, estructura muscular que origina el tabique escrotal el cual divide al escroto en dos bolsas, una para cada testículo. La túnica vaginal envuelve las gónadas y los epidídimos. Los testículos están cubiertos por una membrana fibrosa llamada túnica albugínea que contiene las venas y arterias testiculares. Esta membrana recubre el parénquima de los testículos (Delgadillo, 2004). La función fundamental del escroto aparte de proteger los testículos de agresiones externas es proporcionarle a estos una temperatura ambiente 2 a 3 °C inferior a la existente en el interior del abdomen, acordando una condición adecuada para una correcta espermatogénesis (Durán del Campo, 1993). La regulación de la temperatura se realiza a través de un intercambio de calor a nivel del plexo pampiniforme entre la sangre venosa y la arterial, y por la capacidad del dartos para contraerse y acercar las gónadas al cuerpo (Delgadillo, 2004).

La túnica albugínea emite trabéculas que, dirigiéndose hacia el interior del órgano, dividen al testículo en numerosos lóbulos. Rodeando estos lóbulos y en medio de ellos se encuentra un tejido especial -tejido intersticial- en cuyo seno se agrupan las células de Leydig, encargadas de producir la hormona masculina testosterona. En el interior de cada lóbulo nacen los túbulos seminíferos, integrados por capas concéntricas de células que a través de sucesivas divisiones se transforman en última instancia en espermatozoides (Durán del Campo, 1993).

En la membrana basal del túbulo se encuentran las células mioideas encargadas de la contracción del mismo, así como también células parecidas a fibroblastos (Bielli, 2002). Además se encuentran las espermatogonias (células de la línea germinal), células diploides que dan origen a los espermatozoides haploides. Las células de Sertoli se encuentran dentro de los túbulos, sostienen las espermatogonias y secretan fluido que permite transportar los gametos a la luz tubular (Delgadillo, 2004). Estos túbulos drenan, hacia el centro del testículo en túbulos rectos y desde éstos a una red de conductos llamada *rete testis* la cual se comunica con la cabeza del epidídimo (Salamon y col., 1990). Cuando los espermatozoides salen del testículo son inmaduros, inmóviles e incapaces de fecundar. Pasan al epidídimo a través de los conductos eferentes. El epidídimo es un órgano tubular adherido al testículo y se divide en cabeza cuerpo y cola. La maduración de los espermatozoides, es decir la potencialidad de desarrollar motilidad progresiva, condensación de la cromatina del núcleo y modificación del acrosoma, estabilización de las proteínas estructurales, cambios de la superficie de la membrana plasmática y la migración de la gota citoplasmática de proximal a distal, se efectúan en la cabeza y el cuerpo, mientras que en la cola se almacenan las células maduras (Cooper, 1996; Yanagimachi, 1994, citado por Gil, J., 2002). El conducto que transporta los espermatozoides desde la cola del epidídimo a la uretra (conducto central del pene) recibe el nombre de conducto deferente (Salamon y col., 1990).

Glándulas anexas:

Los últimos 3 o 4 cm de cada conducto deferente, ampollas, son más gruesos y sirven como órgano de almacenaje de los espermatozoides por cortos períodos (Salamon y col., 1990). Éste es el principal sector secretor que aporta compuestos que se integran al plasma seminal y son secretados fundamentalmente durante la eyaculación. La fructosa aportada por las ampollas será el sustrato energético exótico más abundante (Mann, 1974).

Las glándulas anexas (vesciculares, próstata y bulbouretrales) vuelcan su secreción en la uretra, suministrando un vehículo líquido isoosmolar para el transporte durante la eyaculación (Garner y Hafez, 1987; Harper, 1994; citado por Gil J., 2002). Las vesículas seminales se encuentran situadas a cada lado de la parte posterior dorsal de la vejiga y son las responsables de secretar la mayor parte del líquido seminal. La próstata es la única glándula anexa impar y se encuentra situada sobre el cuello de la vejiga. Las glándulas bulbouretrales están situadas en la región caudal de la uretra (Delgadillo, 2004).

La fructosa y el ácido cítrico son las secreciones más importantes de las glándulas vesiculares. Los iones más abundantes del plasma seminal son el sodio y el potasio, y los de menor medida zinc, cobre y hierro. Otro componente del plasma seminal son: prostaglandinas (E y F), enzimas (fosfolipasas, fosfatasas, glicosidasas, etc.) Otras proteínas asociadas a la fertilidad (osteopontina, etc.), péptidos y aminoácidos (ácido glutámico, serina, alanina, etc.), fosfolípidos (colina, etc.), lípidos (colesterol, testosterona, etc.), carnitina, ácido pirúvico, láctico y ascórbico (Mann, 1974).

Pene y prepucio:

El pene y el prepucio son los únicos órganos que deberán manipularse a efectos de extraer semen; el pene del carnero es un órgano fibroelástico constituido por un tejido cavernoso extremadamente irrigado por abundantes vasos sanguíneos. Sus funciones fundamentales son la deposición del eyaculado en el aparato genital de la oveja, más precisamente en la vagina y segundo la expulsión de la orina. La raíz del órgano se inserta en los laterales del arco isquiático, mientras el cuerpo queda suspendido por los ligamentos suspensorios y el glande se proyecta libremente hacia adelante. Inmediatamente detrás del escroto puede notarse la flexura sigmoidea, que le permite al órgano cuando esta retraído, guarecerse dentro del prepucio y en momentos de la erección, protruir hacia el exterior, propulsado por el músculo extractor del pene. Particularmente importante, a los efectos de la extracción de semen, resulta el glande y una proyección filamentosa proveniente de la uretra llamada apéndice vermiforme. En momentos de excitación sexual, los numerosos vasos sanguíneos del pene se contraen, mientras los cuerpos cavernosos se llenan de sangre, provocando la erección y agrandamiento del órgano. Normalmente, el pene permanece dentro del prepucio -que es en realidad una invaginación de la piel- no sobresaliendo al exterior como consecuencia de la flexión sigmoidea (Durán del Campo, 1993).

Eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal

En el organismo la estructura que juega un papel más importante como impulsor de la actividad reproductiva, son un grupo de neuronas con actividad neuroendocrina que sintetizan GnRH, ubicadas en el área preóptica junto al hipotálamo. Estas neuronas emiten proyecciones hacia la eminencia media del hipotálamo para el control de la actividad secretora de la adenohipófisis. En la eminencia media la GnRH es liberada y transportada por medio del

sistema porta hipotálamo-hipofisario hasta la adenohipófisis. Es característico que dicha hormona se secrete de forma pulsátil. De esta manera las células gonadotropas de la adenohipófisis liberan LH, cuya concentración sanguínea varía de forma pulsátil directamente relacionada a la secreción de GnRH. También se libera FSH cuya concentración en sangre periférica es constante. Cada pulso de GnRH determina la liberación de otro pulso de LH. Los niveles casi constantes de la FSH en sangre periférica son adjudicables a su larga vida media, ya que cuando se determinan los niveles de FSH en sangre portal, se encuentra pulsatibilidad. Tanto la LH como la FSH regulan la producción de gametos y de hormonas testiculares (Bielli, 2002).

Existen dos tipos principales de células responsables de la producción de hormonas del testículo: las células de Leydig y las de Sertoli. La producción de testosterona por parte de las primeras, está regulada por la hormona LH y es muy importante para el mantenimiento de la espermatogénesis. La desaparición de la LH lleva a la detención de la producción de testosterona y la reducción del tamaño celular (Courot, 1971; citado por Bielli, 2002). Existe un sistema de retroalimentación negativa muy sensible entre la LH y la secreción de testosterona. Ésta llega a los túbulos seminíferos, necesaria para la adecuada espermatogénesis y especialmente para que transcurra correctamente la meiosis (McLachlan y col., 1995). También importante para el mantenimiento de la libido, actividad secretora de los órganos sexuales accesorios y caracteres sexuales secundarios (Bielli, 2002).

Mientras tanto, la célula de Sertoli es blanco para la FSH, ésta induce la producción de una proteína ligadora de andrógenos (ABP), cuya función es mantener elevada las concentraciones de éstos en los túbulos seminíferos, importantes para el desarrollo normal de la espermatogénesis y actividad general de la célula de Sertoli. Ésta secreta además una hormona llamada inhibina, la cual tiene un efecto supresor de la secreción de la FSH actuando en forma directa sobre las células gonadotropas de la hipófisis.

Examen andrológico

Durante cada periodo reproductivo un carnero sirve entre 30 y 100 hembras a monta natural y si es utilizado en inseminación artificial se pueden cubrir miles de ovejas. Por esto conocer la capacidad o aptitud reproductiva de los carneros es clave. El examen de aptitud reproductiva más importante es el que se realiza 60 días pre-servicio, ya que el proceso de espermatogénesis dura aproximadamente dos meses. Aquí el tamaño testicular es

determinante, ya que indica la producción espermática. En efecto cada gramo de parénquima testicular produce 20 a 25 millones de espermatozoides por día (SUL, 2011).

Examen objetivo general (EOG)

En este examen se obtiene la información necesaria para determinar la normalidad de todos los órganos y sistemas del animal. Se sabe que cualquier alteración de la salud, puede interferir con la normal realización de su actividad reproductora. En este punto se deberá prestar especial atención al sistema locomotor, particularmente al tren posterior, ya que el macho al momento de la cópula descansa todo su peso en los miembros posteriores; así, cualquier lesión de éstos impedirá la cópula normal. De igual importancia son las alteraciones de la columna vertebral así como también lesiones en ojos. Es de vital importancia que el animal vea bien y camine bien. Se debe revisar boca, a fin de eliminar del rodeo aquellos carneros que presenten problemas de dentición (edad avanzada) o patologías congénitas como prognatismo o braquignatismo. Además el examen clínico como es de suponerse, incluirá toda la información obtenida en la historia clínica como son los tratamientos, vacunaciones, desparasitaciones, historia reproductiva y observaciones (Bustamante y Duchateau, 2005).

Examen objetivo particular (EOP)

Se debe evaluar en primera instancia la integridad del prepucio, ver si existen soluciones de continuidad o una posible postitis ulcerativa. Luego se procede a la extracción del pene descartando posible presencia de fimosis o parafimosis, balanitis y retención de cuerpos extraños en el apéndice vermiforme (Frank, 2004).

En cuanto al escroto se comprobará la presencia de adherencias, escoriaciones, heridas, aumento de temperatura, miasis, ectoparásitos, aumento del grosor de la piel y edemas. En áreas calurosas se recomienda esquilarse el escroto si tiene mucha lana (Frank, 2004). En cuanto a los testículos, éstos deben ser de igual tamaño y se deben desplazar sin problemas en el escroto. Las gónadas se palpan a lo largo y deben presentar tono y firmeza adecuada (SUL, 2011). Éstos deben ser firmes y elásticos. Se estima un mínimo de 24 cm de circunferencia escrotal, teniendo en cuenta que a mayor circunferencia escrotal, mayor producción espermática (Frank, 2004).

Luego se revisan las colas de los epidídimos, principal reservorio del esperma. Se puede palpar el cuerpo de los mismos hasta incluso la cabeza, pero lo más significativo es la cola. El tono de los epidídimos es similar al de los testículos (SUL, 2011). Se debe verificar la ausencia de anormalidades y reacción al dolor. Si la cola se encuentra con mayor tono, o si existen asimetrías, se debe descartar la presencia de *Brucella ovis* (Frank, 2004), mediante serología (inmuno-difusión en gel agar).

Colecta de semen

Antes de colectar el semen de un carnero es esencial esquilarse su abdomen y el prepucio y lavarlo, para prevenir contaminación. El lugar de la colección debe ser preferentemente bajo techo y libre de polvo.

Salamon y col. (1990) describen dos métodos de colección de semen denominados vagina artificial y estimulación eléctrica (electroejaculación). Es preferido el primero de los citados dada su rapidez y limpieza, además no es estresante para el semental y proporciona un semen de mejor calidad. Por el sistema de vagina artificial, se puede recoger semen varias veces al día. La estimulación eléctrica se debe usar cuando se precise recoger semen de un macho que no es posible entrenarlo a la vagina artificial; este método tiene el inconveniente de producir malestar en el macho, por lo tanto no se puede hacer frecuentes recogidas de semen. Por otra parte, se contamina fácilmente con orina durante la recogida. El semen obtenido por este método, presenta mayor volumen pero menor concentración que cuando se obtiene por vagina artificial (Marco-Jiménez F y col., 2005).

Mientras que Durán del Campo (1993), sostiene que existe un tercer método de colecta mediante la extracción directa de la vagina de la oveja. El carnero eyacula directamente en la vagina, recuperándose el semen aspirándole con una pipeta; el método es sencillo al no necesitarse instrumental alguno, pero el material recogido es escaso y muy contaminado con fluido vaginal, no siendo apto para inseminación; puede en cambio ser útil para observarlo al microscopio. Sobre este mismo método, Aisen y col. (2004) mencionan la existencia de dispositivos o colectores vaginales de vidrio o de goma que se colocan en el interior de la vagina de la hembra y permiten la cópula libremente. Tienen la dificultad de que es muy probable la pérdida de material y la contaminación de éste con mucus.

Vagina artificial

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la oveja, que proporciona el estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) para la erección del pene y para la eyaculación (Salamon y col., 1990). Durán Del Campo (1993) describe como está constituida la vagina artificial, consta de un tubo externo rígido o semirrígido, de vidrio, ebonita, metal o caucho, de 15 a 20 cm de largo por 6 a 8 cm de diámetro, a través del cual se hace pasar otro tubo de goma o de látex de menor diámetro pero algo más largo y cuyos extremos volviendo sobre sí mismos se asegurarán a los dos extremos rígidos, dejando entre ambos un espacio vacío. En un agujero practicado en el tubo externo se instala una válvula, a través de la cual se echa agua temperada. En uno de los extremos se introduce una copa, destinada a recoger el semen, mientras que en el otro se podrá -si se desea- lubricarse con glicerina o vaselina. La temperatura del interior deberá ajustarse entre 40 y 46°C y la presión ocasionada por el agua y/o aire deberá ser lo suficiente como para estimular la eyaculación, debiéndose tener presente que el exceso de aquella podrá provocar una retención del semen en la uretra y posterior pérdida del mismo, y una presión insuficiente podrá no inducir la eyaculación.

La vagina artificial deberá estar limpia, seca y estéril; una misma vagina, sin limpiar, no se debe utilizar para distintas recogidas de semen. Después de cada uso se debe lavar, enjuagar con agua destilada y secarla profundamente; si se pasa por el interior, una delgada película de alcohol al 70%, luego se secará mejor. Evitar en todo momento que el agua penetre en el tubo interno, ya que puede ser la causa de mortandad de los espermatozoides (Salamon y col., 1990).

Durán del Campo (1993) describe la técnica de extracción del semen. Deberán tenerse en cuenta la sujeción de la oveja, la excitación del carnero y las manipulaciones para lograr la eyaculación. En cuanto a la sujeción de la hembra, si bien es posible extraer semen sujetando la oveja por la cabeza, con carneros ariscos o con dificultades para la monta es conveniente inmovilizarla; en ese sentido es muy práctico disponer de cepos de madera -fijos o transportables- que sujeten a aquellas y permitan maniobrar con comodidad. También es importante disponer de un foso al lado de dicho cepo que permita al operador ubicar su vista a nivel de los genitales y trabajar con mayor precisión.

En cuanto a la excitación del carnero, el mismo autor sostiene que la excitación previa del macho es muy importante y que se recomienda excitarlo mediante distintos procedimientos que incluyen, arrimarlo a los cepos de extracción, contemplar la extracción de sus compañeros

y fundamentalmente, realizar dos o tres falsas montas previas. Todo eso redundaría en la cosecha de un 20 a un 30% de mayor cantidad y calidad de espermatozoides. McGrath y col. en 1979 (citado por Durán del Campo, 1993) realizaron varios ensayos llegando a la conclusión que, utilizando una oveja en celo como maniquí, el volumen de semen aumentó considerablemente aunque no su concentración, determinando de cualquier manera un aumento del 17% de espermatozoides colectados. También se concluyó que la estimulación visual no fue demasiado importante, aunque pareció conveniente que los carneros contemplen la extracción de sus compañeros.

El otro punto que el autor considera importante en la técnica de extracción es la forma de manipulación para lograr la eyaculación. Una vez sujeta la oveja, excitado el carnero y preparada la vagina, el operador debe situarse en el foso y esperar a que se acerque aquel; es probable que este lo haga con precaución, olfatee los genitales, ensaye el reflejo vómeronasal “flehmen” y comience a entrar en erección, asomando el pene fuera del prepucio. En momentos de efectuar el salto e intentar localizar la vulva, el operador deberá tomar el prepucio y desviar el miembro hacia la vagina artificial; si las condiciones de presión y temperatura son las adecuadas, el carnero dará un fuerte envión -golpe de riñón- y la eyaculación se producirá espontáneamente. Si se introduce el pene en la vagina artificial y a pesar de movimientos eyaculatorios ésta no se produce, habrá que estimar que las condiciones de la vagina no son las adecuadas y en consecuencia habrá que corregirlas. Si la temperatura del medio ambiente es baja, se recomienda envolver toda la vagina -incluida la copa- en un saco térmico. Inmediatamente de extraído el semen y corroborado a simple vista su aparente buena calidad, la copa que lo contiene deberá ser cubierta para evitar la contaminación y colocado a temperatura de 15 a 20°C para su evaluación inmediata. Según Salamon y col. (1990) una vez que el carnero eyaculó, se quita la presión de la vagina teniendo la precaución de que no salpique agua cerca de la copa conteniendo el semen. Luego se debe etiquetar la copa, protegerla a modo de evitar un shock térmico y el contacto con la luz, taparla y colocarla en un baño maría a 30°C.

Electroeyaculación

Aisen y col. (2004) señalan que el semen se obtiene por medio de un estimulador eléctrico vía rectal alimentado mediante 220 volts (con transformador reductor), por una batería (12 volts) o un dínamo. La sonda introducida en el recto posee 2 o más electrodos y proporciona

descargas de 4-15 volts. Si la técnica se realiza correctamente, el semen resulta de características similares al obtenido por vagina artificial. De todas maneras, no es raro que por sobre estímulo de las glándulas anexas, el eyaculado sea más diluido o que se pueda contaminar de forma accidental con orina. Esto, sumado al mayor estrés del animal en el proceso, que permite solo 1-2 extracciones por día, convierte a esta técnica en una alternativa a aplicar sólo en caso de que no se pueda extraer con vagina artificial (animales indóciles, imposibilidad no heredable para la monta, etc.).

Se coloca al macho en el suelo o en una mesa acostado sobre un lateral. Es necesario que la zona del prepucio esté libre de lana y suciedad que puedan contaminar el semen. Se introduce la sonda en el recto hasta unos 10 a 20 cm (dependiendo del tamaño individual), procurando no lesionar la mucosa, para lo cual se puede lubricar con unas gotas de agua o solución salina. Se exterioriza el glande y se sujeta el pene por detrás del mismo (por medio de una gasa), introduciéndolo en una copa colectora limpia, seca, estéril y templada. Presionando la sonda hacia el suelo de la pelvis, y a fin de estimular la erección, se aplica 3 a 5 estímulos cortos de 1 a 2 segundos, separados 5 segundos entre sí (evitando el exceso de secreciones de las glándulas anexas). Luego se aplican 1-3 estímulos más prolongados (de 5 a 10 segundos) para estimular la eyaculación, recogiendo el semen en la copa colectora.

Semen

Definición y composición

Salamon (1990) describe al semen como el líquido generativo del macho, ya que contiene los gametos masculinos (espermatozoides). Lo forman dos principales constituyentes: el plasma seminal (74%) y los espermatozoides (26%). El primer constituyente es definido como una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, los epidídimos, conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias. El testículo no contribuye casi nada a la formación del plasma seminal. Dicho plasma tiene tres funciones principales, en primer lugar actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho, durante la eyaculación. En segundo lugar, sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles; por último, proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de los gametos después de depositarse éstos en el aparato genital de la hembra.

El mismo autor señala que el plasma seminal de los carneros es un líquido opaco o claro, aunque el semen puede ser de color blanco o cremoso, debido a su alta concentración en espermatozoides. El principal componente del plasma es agua (75%), aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides. Este líquido es normalmente isotónico y neutro. Las principales sustancias orgánicas presentes en el semen de carnero son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, gliceril, fosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa es la mayor fuente de energía de los espermatozoides.

En cuanto al pH del plasma seminal, éste se mantiene muy próximo a 7 por un complejo de sistema amortiguador. Éste protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas.

El segundo componente del semen son las células espermáticas. Aisen y col., 2004, definen al espermatozoide como célula haploide altamente especializada, cuya función es transportar hasta el ovocito la información genética de su especie. La organización de esta célula incluye una cabeza (con su núcleo y capuchón acrosómico) y una cola (pieza intermedia, pieza principal y porción terminal). La cabeza y la cola se unen por una estrecha porción, el cuello, que presenta cierta facilidad de ruptura.

Como ya se mencionó, la cabeza está materialmente integrada por el núcleo, en el que se disponen los cromosomas, encargados de transportar el material genético paterno. Dichos cromosomas están integrados fundamentalmente por ácido desoxirribonucleico (ADN), al que se le atribuye precisamente el papel de la transmisión hereditaria. Las dos terceras partes de la cabeza, están cubiertas por una especie de capuchón denominado acrosoma, cuya función sería penetrar en las membranas exteriores del óvulo y transportar además las enzimas necesarias para facilitar esa tarea (Durán del Campo, 1993).

El Dr. Durán del Campo, establece que el cuello contiene el centriolo proximal que es donde se origina el movimiento. En su unión con la cabeza, se originan 2 minúsculas fibras (filamento axial) que se agrupan formando 2 anillos concéntricos de 9 fibras cada uno, que envuelven a su vez otras 2 fibras centrales y que prolongándose hasta la pieza final, dan estructura y forman el verdadero esqueleto de la cola. Las 2 fibras centrales incluso se prolongan aún más terminando en la pieza final. El relajamiento y la contracción de estas fibras son las que producen en la cola el característico movimiento de látigo que permite el avance de la célula. La pieza intermedia está constituida por el filamento axial, se encuentra

envuelto por una banda espiral doble. La pieza principal está formada por las 20 fibras del filamento axial (cada vez más finos) y rodeada a partir del centriolo terminal por una triple banda espiral. El filamento axial en todo su recorrido, está encerrado por una vaina lipoproteica. La cola termina en la pieza final, integrada solamente por las fibras sin banda espiral y vaina.

Metabolismo espermático

Salamon y col. (1990), describen que la energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente de la fructosa, presentes en el plasma seminal. La glucosa que también es metabolizada por los espermatozoides, a menudo, se utiliza como componente de los diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides se produce dióxido de carbono (CO_2), agua y algo de ácido láctico.

El CO_2 en alta concentración tiene el efecto de inhibir la motilidad de los espermatozoides y puede ser utilizado como un medio de conservación del semen a corto plazo. El semen sin diluir incubado durante largos periodos de tiempo puede acumular CO_2 en cantidad suficiente para inhibir la motilidad de los espermatozoides. En estos casos se puede recuperar la motilidad diluyendo el semen con diluyente fresco, con lo que también se diluye el CO_2 . Sin embargo, si se acumula ácido láctico metabólico en el semen, el pH puede descender y puede reducir, irreversiblemente la viabilidad de los espermatozoides. Consecuentemente el semen se debe utilizar lo más fresco posible.

Espermiograma

Se define como el análisis macroscópico y microscópico del semen. A raíz del mismo se obtienen datos del volumen, aspecto y pH así como también datos sobre la concentración, motilidad, morfología y longevidad. El objetivo de este estudio es determinar si el semen del carnero es apto para preñar. La evaluación no determina el grado de fertilidad, simplemente nos indica el estado de la muestra o eyaculado al momento de su colección. Solamente podemos certificar o garantizar que un carnero sea considerado apto o satisfactorio para la reproducción luego de un estudio exhaustivo de por lo menos tres muestras seminales. Todos

los materiales y equipos a usar para dicha evaluación, deberán estar secos, libres de polvos, detergentes y a temperaturas entre 35 y 37 °C (Durán del Campo, 1993).

Análisis macroscópicos

En primera instancia se debe evaluar el color y el olor del material colectado. Deberá ser evaluado en el mismo tubo de colecta e inmediatamente de obtenido. Lo normal es blanco-cremoso. La presencia de sangre dará al semen una coloración rosácea. Las coloraciones gris o parda son indicadores de contaminación o alguna clase de infección en el sistema reproductor. Los eyaculados normales son inodoros. En presencia de orina existirá un olor característico además de que la coloración será menos intensa, esto es una posibilidad bastante corriente al utilizar la electroeyaculación como método de colección. En cuanto al volumen, se puede medir directamente en el tubo de recogida si éste se encuentra calibrado. Cuando la recogida se hace con vagina artificial el promedio de volumen es de 1.0 mL., variando de acuerdo con la edad, estado sanitario y nutritivo, régimen sexual, excitación, volumen testicular, etc. (Durán del Campo, 1980).

Otro aspecto a analizar de manera macroscópica, es la movilidad de masa. Según Durán del Campo, éste resulta en el más importante a considerar en el semen del carnero. Para observarla, el tubo o copa recolectora deberán ser sostenidos a la luz (cuidándolo de los rayos solares) debiéndose mantener la vista fija a muy corta distancia de aquella. La movilidad en masa resulta de tres factores: intensidad de la movilidad, cantidad total de espermatozoides y porcentaje de células vivas. Cuando ésta es intensa (a modo de ejemplo un eyaculado de 3 mil millones de spz/mL con un 80% de elementos vivos), será posible apreciar en el material recolector la presencia de verdaderas ondas u olas que se forman y deshacen girando enérgicamente. En eyaculados menos concentrados, dichas ondas no son tan notorias.

Por último, Aisen y col. (2004), consideran al pH como otro aspecto macroscópico importante a evaluar, si bien es una prueba bioquímica. El pH normal del semen es de 6,8.

Análisis microscópicos

Un importante aspecto a considerar es la motilidad de los espermatozoides. Ésta se define como la forma de desplazamiento del espermatozoide, pudiendo ser progresiva cuando se dirige rotando su cabeza hacia adelante; de retroceso cuando por anomalías se dirigen hacia atrás; oscilante cuando gira sin avanzar y vibratorio cuando está animado de simples movimientos de este tipo. De todos estos, el único movimiento útil es el progresivo (Durán del Campo, 1993). Otros autores mencionan como movimiento útil el progresivo rectilíneo uniforme.

Se coloca una gota de semen sobre un portaobjetos limpio, seco y templado (37°C), se observa la onda con pocos aumentos (40x o 100x). Para conocer la motilidad individual es necesario utilizar un cubreobjetos. La proporción de espermatozoides móviles es utilizada para semen que ha sido diluido. En este caso utilizamos el gran aumento del microscopio (400x). El operario debe visualizar varios campos y valorar la proporción (porcentaje) de espermatozoides que son móviles, esto es los que se mueven hacia adelante (Salamon y col., 1990). Por porcentaje de motilidad se entiende la cantidad de espermatozoides con movimiento progresivo existente en 100 células (Durán del Campo, 1993). Si la concentración de espermatozoides es demasiado densa, para observar los espermatozoides aislados, la muestra se debe diluir, en la forma corriente, con un diluyente adecuado.

La motilidad individual también se puede medir luego de un tiempo (1, 2, 4, 6, 12, 24 horas) de haberse extraído una muestra, medida que se conoce como termorresistencia. Esta presenta mayor correlación con la fertilidad, con valores de 0,74, 0,75 y 0,81 para 1, 6 y 24 horas respectivamente (Aisen y col., 2004).

Al mismo tiempo que se determina el porcentaje de motilidad espermática puede valorarse la intensidad del movimiento o vigor. El mismo se clasifica en una escala que va del 0 al 5 (Aisen y col., 2004).

Cuadro 1. Escala de clasificación de las características de motilidad seminal

VALOR	CARÁCTERÍSTICAS
0	Espermatozoides inmóviles o muertos
1	Espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos
2	Espermatozoides con movimiento anormal o eventualmente progresivo
3	Espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso
4	Espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido
5	Espermatozoides con movimiento progresivo y enérgico

Otro parámetro a determinar es la concentración de espermatozoides, que se define como el número de espermatozoides por unidad de volumen (normalmente expresado en ml), es muy importante ya que la relación de dilución depende de ella. El semen de carnero de buena calidad contiene 3,5-6,0 mil millones ($3,5 - 6,0 \times 10^9$ de espermatozoides/ ml). La concentración de espermatozoides puede ser valorado por ensayos basados en la consistencia del semen, o por el uso de un hemocitómetro, colorímetro o contador electrónico de partículas. Los diferentes métodos varían en su rapidez y seguridad.

El método del hemocitómetro es el más lento pero el más seguro. Este consiste en una cámara de conteo (cámara de Neubauer) la que se llena con una dilución del semen con solución salina al 3% (Salamon y col., 1990). La función de la dilución es matar a los espermatozoides sin aglutinarlos, lo que permite el conteo de estos en la cámara.

El examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de éstos es muy alta entonces nos encontraremos ante un semen de baja fertilidad. Los espermatozoides anormales se pueden detectar en un frotis de semen teñido preparado en un portaobjetos. Estas son tareas que consumen bastante tiempo por lo que es impracticable realizarlo en cada eyaculado, a nivel de campo. Este examen tiene verdadera importancia en el estudio de la valoración del semen especialmente cuando la movilidad se encuentra afectada y el aspecto general de la muestra es pobre (Durán del Campo, 1993). Las muestras que contengan más de un 15% de anomalías no deben usarse en un programa de inseminación artificial. Las anomalías espermáticas pueden ser primarias (se originan durante la espermatogénesis), secundarias (durante el paso en el epidídimo) o terciarias (luego de la eyaculación y manejo) (Aisen y col., 2004).

Otro aspecto importante es la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, utilizando la tinción de eosina-nigrosina. La eosina es absorbida exclusivamente por células muertas, no siendo en cambio retenida por las vivas. Esta técnica es más útil en muestras aparentemente pobres (Durán del Campo, 1993).

Existen otros métodos de evaluación dentro de los cuales encontramos los tests biológicos incluyendo la valoración del porcentaje de preñez luego de una inseminación y de la resistencia del espermatozoide y viabilidad. Hay además pruebas bioquímicas, en las que se encuentran la valoración del coeficiente respiratorio, del índice de fructólisis, poder deshidrogenante y acidez. La mayoría de estas pruebas deberán llevarse a cabo en laboratorios a causa de su complejidad, no resultando métodos prácticos para el medio rural. Su utilidad es generalmente más científica que practica.

Estrategias de preservación

Según Aisen (2004), el semen obtenido y evaluado como apto, requiere el procesamiento adecuado para garantizar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el tiempo que hay entre la eyaculación y su utilización para servir a la hembra. El esperma eyaculado no sobrevive durante largos periodos, a menos que se hayan añadido agentes protectores, los diluyentes.

La estrategia más común para prolongar la vida de los espermatozoides es la de disminuir o detener el metabolismo en forma reversible, de modo que una vez dispuesta la inseminación ocurra la reactivación de los procesos necesarios para la fecundación. Controlando la temperatura se reducen los procesos enzimáticos involucrados en el desarrollo de la motilidad espermática, pero hay evidencias de que ocurren otras modificaciones fisiológicas y estructurales que no son totalmente reversibles. Esas modificaciones son consecuencia del manejo aplicado al semen determinando un daño de índole físico, bioquímico y fisiológico al espermatozoide, perdiendo competencia para sobrellevar los procesos necesarios para alcanzar el sitio y el proceso de fecundación (Hammerstedt y col., 1990).

El semen podrá procesarse para tres usos básicos: semen en estado fresco, puro o diluido (de 30 a 37°C, por no más de 90 minutos); semen refrigerado (de 5 a 15 °C, hasta 12-24 horas); semen congelado (-196 °C, por tiempo indefinido) (Aisen, 2004).

Semen fresco

La inseminación con semen recolectado recientemente, sin un descenso térmico para su conservación, es posible solo cuando ambos procesos se practican en el mismo establecimiento. Una vez obtenido el eyaculado, se deberá mantener en un baño maría a 30 °C, evitando cambios térmicos (en especial si se utiliza puro). El semen fresco puede usarse puro o diluido. (Aisen, 2004). En este caso, el diluyente se utiliza principalmente para aumentar las dosis y servir más hembras.

Semen refrigerado

La preservación a bajas temperaturas, 5 °C resulta adecuada para periodos entre 12 y 24 horas (Salamon y col., 1990). La fertilidad tras la inseminación artificial declina en relación al tiempo de preservación del semen, siendo más marcado luego de las 24 horas de almacenamiento, debido a que los espermatozoides experimentan cambios que determinan una menor vida media (Maxwell y Watson, 1996).

Salamon y col. (1990), establecen que se debe llegar a 5 °C en 2-3 horas, debiendo ser gradual el descenso. Se deberá poner especial atención en evitar un descenso rápido desde 18 a 5 °C, ya que, en este margen de temperatura los espermatozoides son especialmente sensibles al shock por frío. Es importante que el semen se mantenga precisamente a esa temperatura, durante todo el tiempo que demore su almacenar. A temperaturas superiores de 5 °C, la motilidad y metabolismo de los espermatozoides no están suficientemente inhibidos.

El periodo máximo de conservación para obtener un grado aceptable de fertilidad por inseminación cervical, es de 24 horas. Si el semen de carnero se deposita quirúrgicamente en el útero (inseminación intrauterina), su grado de fertilización, conservado a 5 °C, aumenta considerablemente, hasta 6 días después de almacenado. Por encima de esta cifra comienza a declinar y el semen conservado más de 10 días presenta una pérdida de la fertilidad francamente alta, con lo que parece que este tiempo es el periodo máximo en que las células espermáticas mantienen su capacidad fecundante. La utilización de la técnica de inseminación intrauterina (por laparoscopia) puede, por lo tanto, utilizarse hasta 6 días después de conservado el semen.

Semen congelado

Gil y col. (2005) mencionan que la congelación de semen es la que despierta mayor interés por el potencial impacto que tiene para los programas de mejoramiento genético, comercio de semen, formación de bancos de semen, como “seguro de vida” de reproductores valiosos, y en la producción de embriones (dosis de alto valor para inseminar hembras en superovulación y transferencia de embriones). Puede considerarse que el metabolismo espermático queda detenido en el semen congelado, y aunque se ha detectado algunos cambios a nivel molecular, éstos se han manifestado en detrimento en la fertilidad (Salamon y Maxwell, 1995).

La fertilidad relativamente baja del semen congelado, después de la inseminación cervical, está relacionada con la reducida viabilidad de los espermatozoides congelados-descongelados. Existen muchas dificultades para obtener suficiente población de espermatozoides viables en el cérvix y su transporte a través de éste y del útero para llegar al oviducto. Se ha encontrado una solución práctica al problema de obtener buenos índices de fertilidad con semen congelado de carnero, la cual consiste en la inseminación intrauterina con la ayuda de un laparoscopia.

Diluyentes

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen a la vez que posibilitan el procesamiento de un número previamente establecido de espermatozoides, acondicionado en envases adecuados, de un tamaño conveniente (Cavestany, 1994).

Salamon y col. (1990), mencionan que la dilución del semen se realiza por razones tanto técnicas como biológicas. En cuanto a las razones técnicas, los autores expresan que en la inseminación natural se depositan miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra. Sin embargo, de este gran número solamente unos 100 a 140 millones atraviesan el cérvix. Cuando se utiliza la IA, tanto el volumen de inseminación como el número de espermatozoides que contiene, se reducen sustancialmente al compararlo con la inseminación natural. El límite inferior, generalmente aceptado como resultante de un buen índice de fertilización, tras la IA cervical, es de 100 millones de espermatozoides por dosis inseminante, de esta forma se puede inseminar un gran número de hembras con tan solo un eyaculado.

El volumen adecuado para la inseminación cervical es de 0,05-0,20 mL; si se utilizara semen sin diluir este volumen contendría un número de espermatozoides superior al deseado. El problema de reducir el número de espermatozoides a la dosis requerida, manteniendo un volumen adecuado, se soluciona mediante la dilución del semen.

En cuanto a las razones biológicas, los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, sistema amortiguador a los cambios de pH y un ambiente isotónico. Además, protegen a los gametos del shock de frío cuando son enfriados y conservados así, o contra las injurias de la congelación, ya que el plasma seminal le proporciona al espermatozoide una protección limitada contra los cambios de temperatura.

Principios y componentes básicos

Temperatura: la actividad metabólica es proporcional a la temperatura absoluta de modo que la disminución de ésta es el mecanismo principal para enlentecer las reacciones químicas y prolongar la vida de las células (los espermatozoides consumen 42 veces más oxígeno a 37 que a 5°C). Al mismo tiempo que disminuye la temperatura ocurren cambios en el ambiente interno y externo del espermatozoide. La solubilidad de los gases en el ambiente externo aumenta (el O₂ se duplica y el CO₂ se triplica), esto permite que una mayor proporción de la actividad metabólica total sea realizada a través del metabolismo oxidativo. Si los espermatozoides son enfriados a 5 °C sin un medio protector, sufren un shock de frío.

Energía: el requerimiento principal de energía del espermatozoide es para mantener la motilidad pero se requiere energía adicional para el mantenimiento celular. Una simple fuente de energía, como fructosa o glucosa (capaces de penetrar al espermatozoide) se debe adicionar al diluyente para proteger las reservas intracelulares (la fructosa presente en el plasma seminal se diluye considerablemente con la extensión). En ausencia de éstos, las células pueden oxidar fosfolípidos intracelulares lo que resulta nocivo para la misma. La yema de huevo y la leche contienen glucosa así como otros compuestos utilizados por el espermatozoide.

Osmolalidad: se define como el número de partículas suspendidas como solutos en una solución. Influye no solamente por la presión osmótica de una solución sino el punto al cual el solvente se congela. Por lo tanto la disminución del punto de congelación de una solución refleja su concentración osmolal. Los espermatozoides se comportan como osmómetros y son

capaces de grandes cambios de tamaño, dependiendo de la tonicidad del medio en que se encuentran. Si la tonicidad del medio se desvía considerablemente, los espermatozoides pueden mostrar colas dobladas, nadar en círculos y morir. Los diluyentes elaborados para preservar el semen deben ser isotónicos bajo las condiciones de su empleo para no causar daños morfológicos o funcionales.

Los di y trisacáridos, los cuales no pueden ser metabolizados por los espermatozoides, contribuyen a mantener el balance osmótico, actuando como sustituto de electrolitos.

Buffers y pH: los espermatozoides necesitan ser protegidos contra una autointoxicación debida a productos ácidos (ácido láctico) derivados de su metabolismo. La motilidad y fertilidad se preservan bien en yema de huevo y leche con pH neutro.

Hay sustancias buffers y no iónicas disueltas en el medio para mantener la osmolalidad y el pH. Entre éstas se encuentran: citrato de sodio (dihidrato), TRIS, TES, TEST (TRIS+TES), glutamato monosódico, diferentes buffers con combinaciones de soluciones salinas o carbohidratos y preparaciones a base de leche.

Inhibición del crecimiento de microorganismos: los medios proporcionan un buen ambiente para el desarrollo de microorganismos, los que a su vez producen productos que pueden ser dañinos para los espermatozoides y que pueden infectar a las hembras. Algunos organismos se encuentran en el semen de machos sanos aun en condiciones asépticas de colección y procesamiento. Es por lo tanto, una práctica común y adecuada, incluir antibióticos tales como penicilina y estreptomina que podrán usarse juntas a razón de 1000 UI y 1000 µg respectivamente a los diluyentes. No son necesarios cuando el semen se utiliza inmediatamente de extraído, pero son útiles en caso de conservación del mismo.

Exclusión de materiales tóxicos: los diluyentes deben ser formulados no solamente para prevenir la formación de productos tóxicos durante el almacenamiento, sino que además deben estar libres de sustancias que puedan ser dañinas a los espermatozoides, tales como metales pesados, de modo que debe emplearse siempre agua destilada.

El agua destilada (o bidestillada) actúa como solvente para los componentes seminales y del diluyente.

“Efecto diluyente”: la dilución de los espermatozoides, particularmente en medios sintéticos, declinan su motilidad en una relación directa a la tasa de dilución. Las causas de este efecto, parecen ser debidas a una pérdida de componentes del espermatozoide en presencia de un medio muy diluido. Por otra parte el semen debe ser mezclado con una cantidad suficiente de

diluyente de manera que la concentración inicial de espermatozoides sea diluida hasta llegar a un número deseado de espermatozoides para una dosis inseminante.

Para reducir este “efecto diluyente” es que se le agrega agentes protectores tales como macromoléculas, presentes en productos naturales como yema de huevo o leche.

Protección de los espermatozoides contra el shock de frío: cuando los espermatozoides son enfriados a 5°C, están sujetos a un shock de frío que afecta la membrana plasmática y causa la pérdida de enzimas intracelulares, lipoproteínas, potasio, ATP y otros materiales de las células. Más aun, la motilidad disminuye y las colas se pueden doblar. Si los espermatozoides son enfriados lentamente, especialmente por debajo de los 20°C, el daño es menos severo, lo que indica que ocurren cambios internos y externos a un ritmo que permite a la célula ajustarse a la caída de temperatura. El medio más efectivo para proteger los espermatozoides contra los efectos del enfriamiento es la lecitina, proteínas, lipoproteínas y compuestos similares presentes en la yema de huevo o leche.

Concentraciones aproximadamente del 20% de yema de huevo son comunes en la mayoría de los diluyentes, actúa previniendo el shock de frío a través de sus constituyentes (lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas).

En el caso de la leche (entera o descremada), la caseína es la sustancia responsable de la protección contra el shock de frío (Cavestany, 1994).

Diluyentes naturales

Diluyentes a base de leche: la fracción proteica (caseína) de la leche es la responsable de las propiedades de la leche como diluyente, las cuales son: actuar como buffer ante cambios de pH, actuar como agente quelante y proteger los espermatozoides durante la reducción de temperatura.

En condiciones de campo el diluyente de semen más accesible es la leche de vaca entera, descremada o en polvo para reconstituir. En el caso de utilizar leche entera, debido a su alto contenido graso se dificulta su visualización al microscopio, por lo que se recomienda retirar la grasa de la superficie (nata) antes de su calentamiento (Salamon y col., 1990). Cualquier tipo de leche que se utilice, debe ser sometida a un previo calentamiento a baño maría, por encima del punto de pasteurización, a 92-95 °C por 8 a 10 minutos (no debe hervir), con el fin de inactivar las lacteninas de la fracción proteica. El procedimiento logra mejores resultados

si se repite nuevamente a intervalos de 24 horas (tindalización). Actualmente, en virtud de la disponibilidad del producto ultra-pasteurizado (UHT), podemos obviar los complicados tratamientos de inactivación que son necesarios para evitar el efecto nocivo de algunos de sus componentes (Jones, 1972; García y Graham, 1987). La lactenina es un agente espermicida, al calentar la leche se logra que ésta libere los grupos sulfhidrilos, eliminando probablemente su efecto tóxico (Cavestany, 1994).

Durán del Campo (1993), señala que la leche posee además citratos, fosfatos y azúcares.

Existen otras sustancias naturales que han sido utilizadas para la dilución del semen tales como el aloe vera y la leche de coco, encontrándose como inconveniente la variabilidad en calidad y cantidad del último producto mencionado (Fernández Abella y col., 2001).

Diluyentes sintéticos

Los diluyentes más comúnmente utilizados para diluir el semen de carnero, contienen como amortiguador TRIS o citrato; como fuente de energía glucosa o fructosa; y para proteger la membrana espermática del frío la yema de huevo (Maxwell y Salamon, 1993).

Los buffers orgánicos (TRIS) tienen una capacidad de amortiguar los rangos de tolerancia de los espermatozoides (pH 6,5-7,5) superior a los buffers inorgánicos (citrato) (Aisen, 2004). Su función principal es la de neutralizar el ácido láctico, producto del metabolismo de los espermatozoides. Estos buffers atraviesan las membranas y también cooperan con el equilibrio interno (Maxwell y Salamon, 1993). El efecto del TRIS ha sido comparado con el citrato y la leche resultando superior que éstos (Paulenz y col., 2002).

Diluyentes en base a TRIS (hydroxymetil amino metano): es el principal componente estudiado de los diluyentes para el almacenaje del semen. Concentraciones de 10 a 50 mM presentan bajo o nulo efecto sobre la motilidad y metabolismo del espermatozoide, pero concentraciones superiores fueron reportadas como positivas para el almacenaje (Maxwell y Salamon, 1993; Salamon y Maxwell, 2000). Se han formulado distintas combinaciones para la elaboración de un diluyente en base a TRIS, sin embargo Salamon y Maxwell (1990), describen y recomiendan como diluyente en base a TRIS y el agregado de ácido cítrico (como antioxidante), fructosa (fuente de energía), yema de huevo (protector ante el shock térmico), agua destilada y antibióticos.

Diluyentes en base a citrato: El citrato es un amortiguador de pH inorgánico, es altamente utilizado en la formulación de diversos diluyentes sintéticos descritos. Los mismos autores recomiendan un diluyente sintético para semen de carnero en base a citrato de sodio, glucosa, yema de huevo y agua destilada.

Agentes protectores de membrana

Como ya se mencionó el mayor avance en materia de diluyentes de semen, surgió con el descubrimiento de la yema de huevo en 1939. Ésta resulta a través de sus constituyentes: lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas, un excelente protector de la membrana espermática, además de conservar la motilidad, la integridad acrosómica y mitocondrial de los espermatozoides; posee además glucosa para ser metabolizada por las células y elementos proteicos y vitamínicos otorgando finalmente un interesante grado de viscosidad que hace al semen más manejable. Resulta un elemento imprescindible en casi todos los diluyentes (Durán del Campo, 1993). Incluso, Salamon y Maxwell (2000), describen que la acción protectora de la leche se puede reforzar con la adición de yema de huevo (5%) y glucosa (1%). La glucosa se agrega con el fin de evitar una posible reacción de coagulación de la yema de huevo.

Jones y col. en 1972, reportaron que la inclusión de yema de huevo en un 3% a los diluyentes comerciales, reduce la frecuencia de cambios en el acrosoma y en la pieza media de los espermatozoides cuando éstos son refrigerados a 5 °C. De todas formas, Watson y Martin en 1976, notaron una disminución de la fertilidad al agregar un 6% de yema de huevo, en comparación con el agregado en una proporción del 1,5%. Esto coincide con lo descrito por Gil y col. en 2003, que explican que en exceso, puede ser contraproducente en el mantenimiento de la integridad ultra estructural del espermatozoide, pudiendo afectar la fecundación o la normal descondensación de la cromatina nuclear de la célula y alterar la viabilidad del embrión.

Bosseau y col., en 1998, establecen que tanto la yema de huevo como la leche, se encuentran generalmente contaminados con bacterias o con micoplasmas. También señalan que la contaminación bacteriana es peor en huevos comprados que en frescos y que la adición de antibióticos en diluyentes en muchas ocasiones no suprime la contaminación.

Principales causas de la disminución de la fertilidad del semen almacenado líquido

Se ha vuelto evidente, que la preservación de semen de carnero afecta de manera importante muchos atributos de dicho material, tales como la motilidad, la actividad respiratoria de la célula, el estado de membrana y la calidad del ADN. Consecuentemente la viabilidad del semen se ve disminuida y por tanto, su capacidad fertilizante, el transporte de espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra se ve inhibido, el tiempo de fertilización del ovocito se retrasa y por eso se ve alterado el desarrollo del embrión en comparación con espermatozoides frescos. A pesar de que se hayan establecido una amplia variedad de métodos para el procesamiento, el almacenamiento y la inseminación, la fertilidad es generalmente más baja luego de la inseminación cervical con semen que fue almacenado en comparación con semen fresco (Maxwell y col., 1996).

La principal causa de disminución de la fertilidad del semen conservado, parece residir en que se altera la capacidad de transporte de los espermatozoides, desde el cérvix al lugar de fertilización. La motilidad de las células se comienza a perder a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. 24 horas es el período máximo aceptable de conservación para semen líquido de carnero según Salamon y col. (1990).

El cérvix constituye la primera barrera para el avance espermático. Una proporción relativamente pequeña de las células depositadas en el orificio del cérvix logran atravesar este órgano. Por lo que, una deposición del semen más próxima al lugar de fertilización, mejoraría los índices de fertilidad y minimizaría el envejecimiento de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino. Una disminución de la fertilidad y un simultáneo aumento de anomalías en el desarrollo embrionario, se asocian a ovocitos que fueron fecundados por espermatozoides envejecidos. Además de la poca sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto femenino, la mortalidad embrionaria temprana es considerada como una de las causas más importantes de la baja fertilidad en ovejas luego de la inseminación con semen almacenado líquido. Muchos investigadores han reportado que un aumento en la mortalidad embrionaria es proporcional al aumento de la duración almacenamiento del semen en estado líquido (Maxwell y Salamon, 1993), esto se explica en una asincronía entre la edad del espermatozoide y el ovocito al momento de la fecundación.

La membrana plasmática del espermatozoide esta ricamente dotada con ácidos grasos insaturados y es por eso susceptible a daños por peroxidación (Jones y col., 1972). La respiración mitocondrial genera normalmente radicales de oxígeno, compuestos sumamente

reactivos que pueden alterar la estructura del ADN, proteínas y lípidos de membrana. Las células poseen mecanismos enzimáticos y compuestos reductores a fin de mantener un nivel adecuadamente bajo de dichas especies reactivas de oxígeno (Aisen, 2004). A medida que los espermatozoides van muriendo durante el almacenamiento, el pH del medio se va tornando más ácido, lo que provoca una inhibición de la actividad enzimática de la célula. Resultando en daños peroxidativos a causa de los productos de la respiración. Es por eso, que se utilizan buffers en los diluyentes, para controlar el pH del medio de preservación. También es recomendado el uso de antioxidantes para la prevención de los daños peroxidativos.

En situaciones naturales, tras la eyaculación, el espermatozoide es capacitado en el tracto femenino (Yanagimachi, 1994; citado por Gil, J., 2002). Los procesos de enfriamiento del semen previo al almacenamiento, y de calentamiento para su uso posterior, producen cambios similares a la capacitación fisiológica, los cuales determinan desestabilización de membranas conllevando a la reacción acrosómica y muerte espermática posterior. Aunque la capacitación del semen se desencadene por procesos no fisiológicos, es probable que estos espermatozoides adelantados en la capacitación tengan una vida media breve en virtud de que sus membranas se hallan relativamente más desestabilizadas que los no capacitados, y propensos de continuar con el proceso de reacción acrosómica, espontáneo en este caso. El hecho de que el semen refrigerado posea una vida media más corta debido a su estado avanzado de capacitación, provoca que el semen tenga menos duración en las zonas posteriores del tracto reproductor de la oveja (en comparación con el semen fresco), disminuyendo así la llegada de los espermatozoides al sitio de fecundación (Maxwell y Watson, 1996).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La motilidad individual de los espermatozoides y el vigor se ven afectados durante su preservación por el tiempo, la raza, el método de colecta de semen y el diluyente empleado.

Objetivo general:

Evaluar la eficacia de tres diluyentes (leche UHT descremada, leche UHT entera y un diluyente comercial Verde® -IMV, Francia-) en semen fresco (tiempo 0) y refrigerado a 5°C por 4, 12 y 24 horas.

Objetivos específicos:

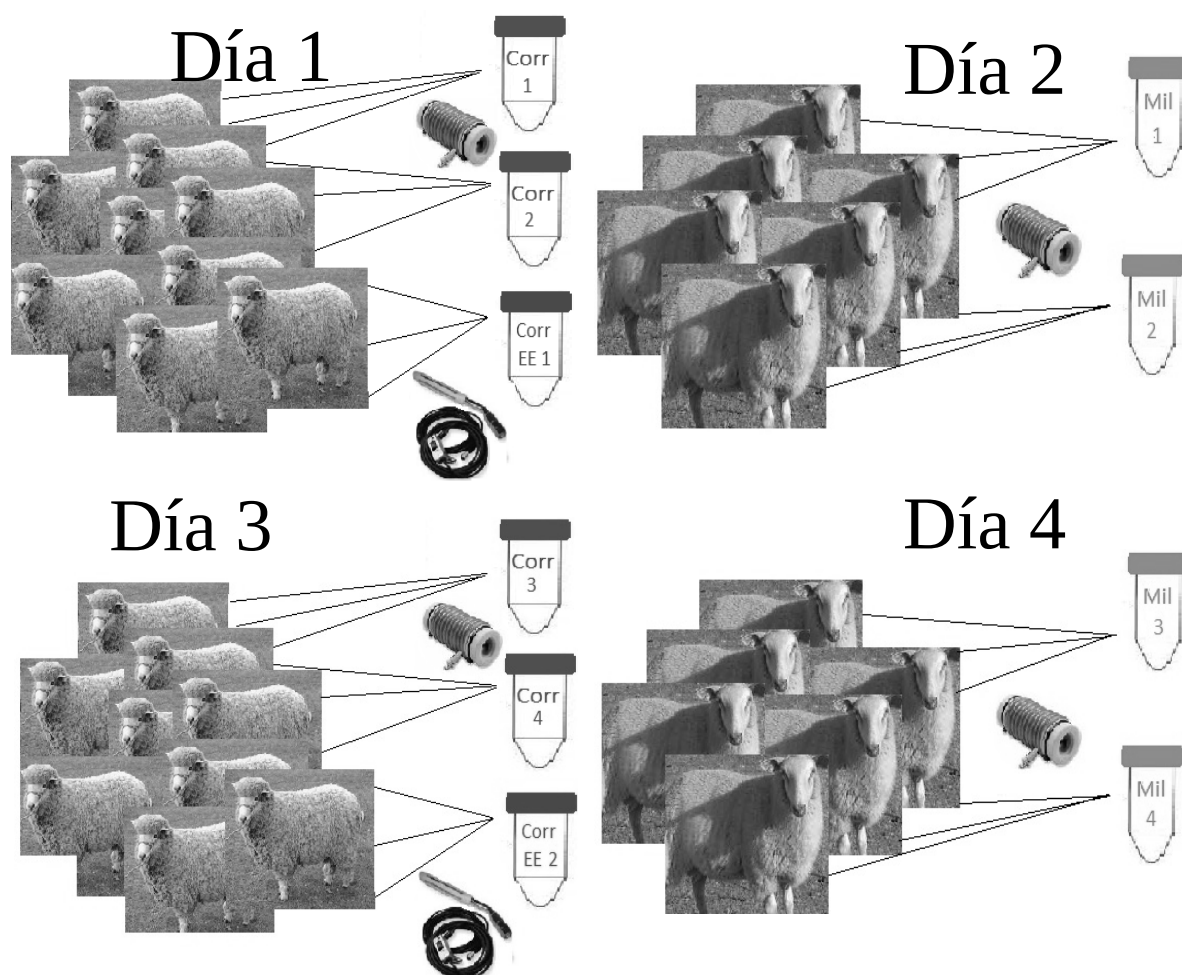
- Determinar si existen diferencias en motilidad y vigor entre los distintos tipos de leche UHT (entera o descremada).
- Determinar si el diluyente en base TRIS (Verde® -IMV, Francia-) se comporta de igual manera que la leche.
- Determinar si la eficacia de los diluyentes en estudio se ve influenciada por la raza.
- Determinar si el método de colecta de semen afecta el desempeño de los extensores seminales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Campo Experimental N°1 (Migues) de Facultad de Veterinaria, ruta 108 km 12; paraje Ombúes de Bentancour del departamento de Canelones.

Se recolectó semen de carneros Corriedale (n=9), Milschaff (n=6), todos adultos (6-8 dientes) y clínicamente aptos. Estos fueron evaluados 60 días previos al ensayo mediante un exhaustivo examen de aptitud reproductiva. El estudio se realizó en el período de marzo-abril, correspondiéndose con la época reproductiva del ovino.

Figura 1. Rutina de extracciones



De los 9 carneros Corriedale se tomaron al azar 6 de los cuales se obtuvo semen mediante vagina artificial para formar 2 pools de 3 eyaculados cada uno (un eyaculado por animal). A los tres animales restantes se les colectó mediante electroeyaculación formando un pool también de tres eyaculados (uno por animal). Este procedimiento se repitió a las 48 horas obteniéndose en total 2 eyaculados por animal. Mientras que para la raza Milschaff se utilizó

únicamente vagina artificial tomando al azar 3 eyaculados, uno por animal, para cada pool (2 pools en total). Esto se repitió a las 48 horas utilizando un total de dos eyaculados por animal. El pool fue realizado con el fin de minimizar el efecto individual de cada macho, y se realizaron dos colectas a cada uno para disminuir la variación entre eyaculados (Windsor, 1997).

Se utilizó un electroeyaculador manual, marca -IMV, Francia-. El mismo fue operado mediante profesionales con experiencia en dicha técnica. La metodología utilizada fue una serie de impulsos crecientes en tiempo, y no en intensidad. La misma metodología para todas las muestras.

Se evaluaron características macroscópicas del semen obtenido observando color, olor, motilidad de masa (subjetivamente) y volumen (en copa graduada). Con el semen considerado apto se realizó el pool. Las características necesarias para considerar apto al eyaculado fueron: presencia de motilidad de masa, color blanco-cremoso, olor sui generis y un volumen de 0,75 – 2 mL. Las muestras se mantuvieron en baño maría a 35 °C hasta su evaluación microscópica para evitar el shock de frío de los espermatozoides. En menos de 10 minutos el material se encontraba en el laboratorio para proceder al estudio del mismo.

Luego se procedió a la evaluación microscópica de las muestras (pool). Para calcular la concentración de cada una de las muestras se utilizó una pipeta de Potain logrando una dilución 1/200 (semen/formol salino bufferado). Se cargó la cámara de Neubauer y se contaron los espermatozoides (Aisen, 2004). Para determinar la cantidad de espermatozoides por eyaculado, se multiplicó la concentración (contada en cámara de Neubauer) por el volumen. Se prosiguió con la evaluación de los otros parámetros en aquellos casos en que la concentración fue mayor o igual a 3×10^9 espermatozoides / mL.

El pool se dividió en tres partes iguales y se procedió a hacer la dilución. Ésta fue a razón de 2:1 para los tres diluyentes en estudio.

Diluyente A: leche entera UHT sin adición de antibióticos ni yema de huevo

Diluyente B: leche descremada UHT sin adición de antibióticos ni yema de huevo

Diluyente C: Diluyente comercial Verde® -IMV, Francia-. Éste es a base de TRIS. Antes de ser utilizado se le agregó 20% de yema de huevo fresco.

Una vez realizadas las diluciones se obtuvo una alícuota de cada pool para la evaluación de la motilidad individual, la misma se colocó sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Esto se colocó sobre una platina térmica que mantenía la temperatura a 37 °C. Se visualizó en microscopio óptico de visión directa primero a aumento 100x y luego 400x. Se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles, obteniéndose mediante la observación de que proporción de espermatozoides se movía en 10 observados. Se realizó el promedio de 4 observaciones realizadas por cuatro operadores distintos.

Al mismo tiempo que se midió el porcentaje de motilidad espermática se pudo valorar el tipo de movimiento o vigor, brindándose valores del 0 al 5 (Aisen, 2004). También se realizaron 4 mediciones y el resultado se obtuvo por el promedio de las mismas.

Las muestras se envasaron a granel sin cámara de aire, el enfriamiento fue realizado paulatinamente y se mantuvieron refrigeradas a 5°C en una heladera previamente calibrada y controlada mediante una termocupla.

Pasadas las 4 horas se procedió a extraer 0,5 mL de cada muestra de la heladera, temprarlas a baño maría a 35 °C durante 10 minutos y proceder a la evaluación de la motilidad individual y el vigor de la misma manera que se realizó en la primera instancia.

El procedimiento se repitió a las 12 horas y a las 24 horas de extraída la muestra.

Análisis estadístico:

La motilidad y vigor se analizaron mediante análisis de varianza (Proc GLM, SAS), utilizando como variables independientes motilidad y vigor, mientras que como variables dependientes el diluyente, la raza, el método de colección, el tiempo y su interacción. Las medias se compararon por el método LSD tomando 5% como diferencia estadística. Los resultados se expresan en medias $\pm$ e.e.m.

RESULTADOS

Se realizaron las interacciones raza-diluyente y método de colección-diluyente no obteniendo diferencias significativas en ellas, por lo que se procedió a estudiar las otras interacciones posibles graficadas a continuación.

La motilidad individual según el tipo de diluyente utilizado se muestra en la figura 2.

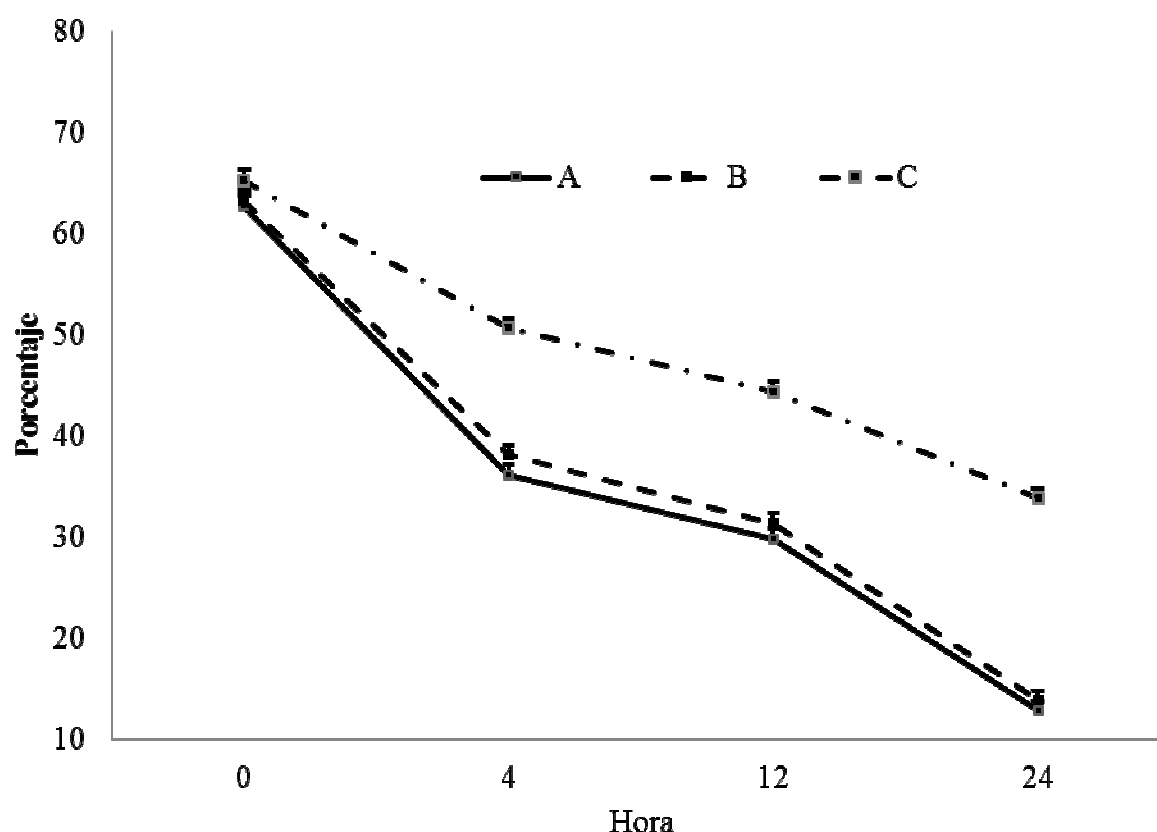


Figura 2: Porcentaje de motilidad a las 0, 4, 12, 24 horas según diluyente (Diluyente A: leche entera UHT, Diluyente B: leche descremada UHT, Diluyente C: Diluyente comercial Verde® -IMV, Francia-).

Los diluyentes A y B se comportaron de manera casi idéntica, registrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) con el diluyente C, que por otra parte mantuvo mejor la motilidad en el tiempo.

La motilidad inicial (tiempo 0) fue cercana al 70%, similar para los tres diluyentes ($p > 0,1$). Se observó una disminución de la motilidad en función del tiempo independientemente del diluyente utilizado. El vigor mostró una curva similar al parámetro anterior comenzando para las tres variables en valores cercanos a 4,0 puntos. En el tiempo 1 (4 horas) no se observaron

diferencias entre los diluyentes A y B ($p>0,05$). Se registró una motilidad de alrededor del 40% y un vigor por debajo de 3,0, mientras que sí se encontraron diferencias de ambos con el C ($p<0,05$), que mantuvo valores por encima del 50% y alrededor de 3,5 puntos de vigor. A las 12 horas, la relación entre las variables se mantuvo, A y B permanecieron sin diferencias entre ellos ($p>0,05$) y las mantuvieron con el diluyente C ($p<0,05$). Los primeros conservaron una motilidad del 30% aproximadamente, mientras que para el C se observó 50% de espermatozoides móviles. En cuanto a los puntos de vigor tanto la leche entera (diluyente A) como la descremada (diluyente B) se encontraron alrededor de 2,0. El diluyente comercial (diluyente C) presentó valores próximos a 3,0. A las 24 horas las diferencias se mantuvieron igual que en la observación anterior, registrándose para A y B valores por encima del 10%, entre 1,0 y 1,5 de vigor y para C valores superiores al 30% y por encima de 2,5 para el segundo parámetro como indica el cuadro 2.

Cuadro 2: Puntos de vigor a las 0, 4, 12, 24 horas según diluyente (media $\pm$ e.e.m.).

DILUYENTES	HORAS			
	0	4	12	24
UHT entera	3,8 $\pm$ 0,2 ^a	2,5 $\pm$ 0,2 ^a	2,0 $\pm$ 0,2 ^a	1,2 $\pm$ 0,2 ^a
UHT descremada	3,8 $\pm$ 0,2 ^a	2,5 $\pm$ 0,2 ^a	2,0 $\pm$ 0,2 ^a	1,2 $\pm$ 0,2 ^a
Verde® -IMV-	3,9 $\pm$ 0,2 ^a	3,2 $\pm$ 0,2 ^b	2,8 $\pm$ 0,2 ^b	2,3 $\pm$ 0,2 ^b

No se observaron diferencias de motilidad entre razas durante el estudio (Figura 3).

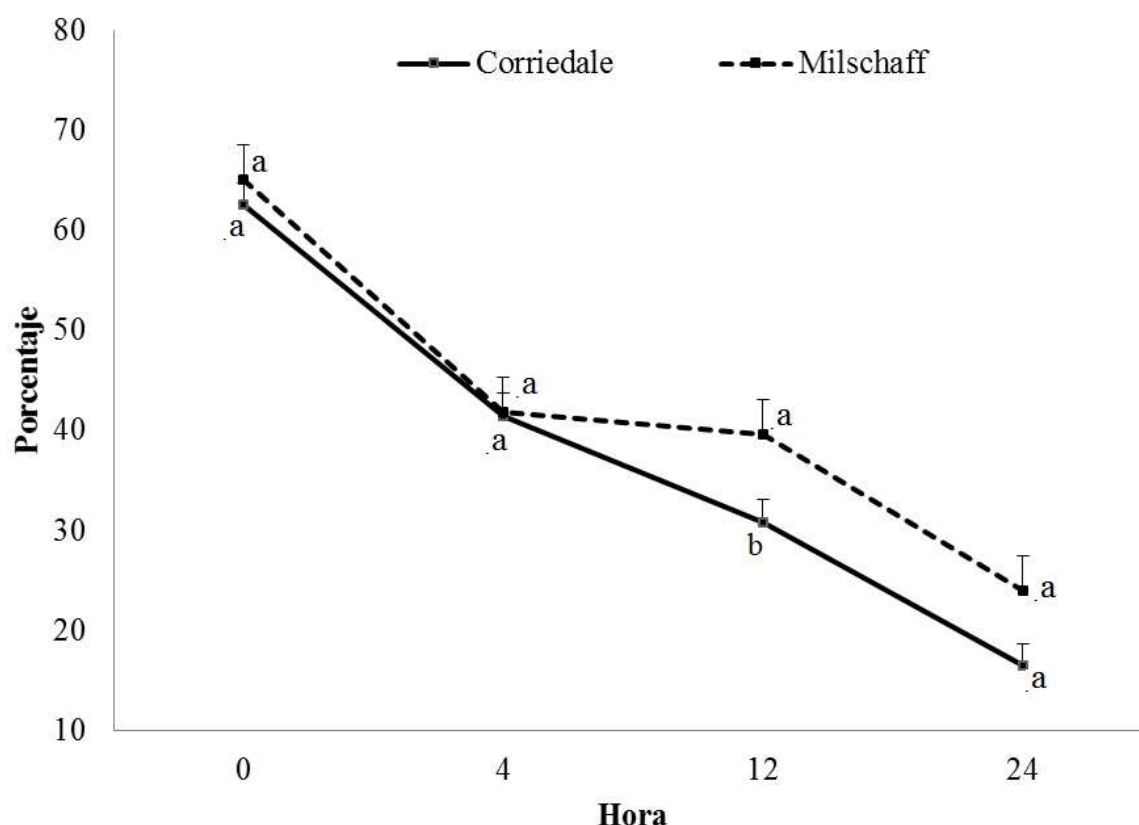


Figura 3: Porcentaje de motilidad progresiva en los distintos momentos de evaluación según las distintas razas.

En el tiempo 0, no se encontraron diferencias significativas en motilidad entre Corriedale y Milschaff ($p>0,05$), siendo cercana al 70% y un vigor próximo a 4,0. A las 4 horas de observación la relación entre razas se mantuvo con valores entre 50% y 60% y entre 2,5 y 3,0. A las 12 horas se observó una diferencia significativa previamente no observada. La motilidad individual en las muestras de los carneros Milschaff fue cercana al 50%, mientras que para los Corriedale fue del 40%. El vigor en este momento se encontraba por encima de 2,5 para el primer grupo de animales y cercano a 2,0 para el segundo grupo (cuadro 3). A las 24 horas se observó una tendencia a disminuir las diferencias ($p=0.046$). La raza Milschaff sostuvo valores cercanos al 30% y a 2,0 mientras que para la Corriedale éstos fueron por debajo del 20% y próximos a 1,5.

Cuadro 3: Puntos de vigor según raza en un período de 0, 4, 12, 24 horas (media $\pm$ e.e.m.).

RAZA	HORAS			
	0	4	12	24
Corriedale	3,7 $\pm$ 0,1 ^a	2,7 $\pm$ 0,1 ^a	2,0 $\pm$ 0,1 ^b	1,4 $\pm$ 0,1 ^a
Milschaff	4,1 $\pm$ 0,2 ^a	2,7 $\pm$ 0,2 ^a	2,5 $\pm$ 0,2 ^a	1,8 $\pm$ 0,2 ^a

La figura 4 compara la motilidad individual obtenida según los distintos métodos de colección de semen en función del tiempo.

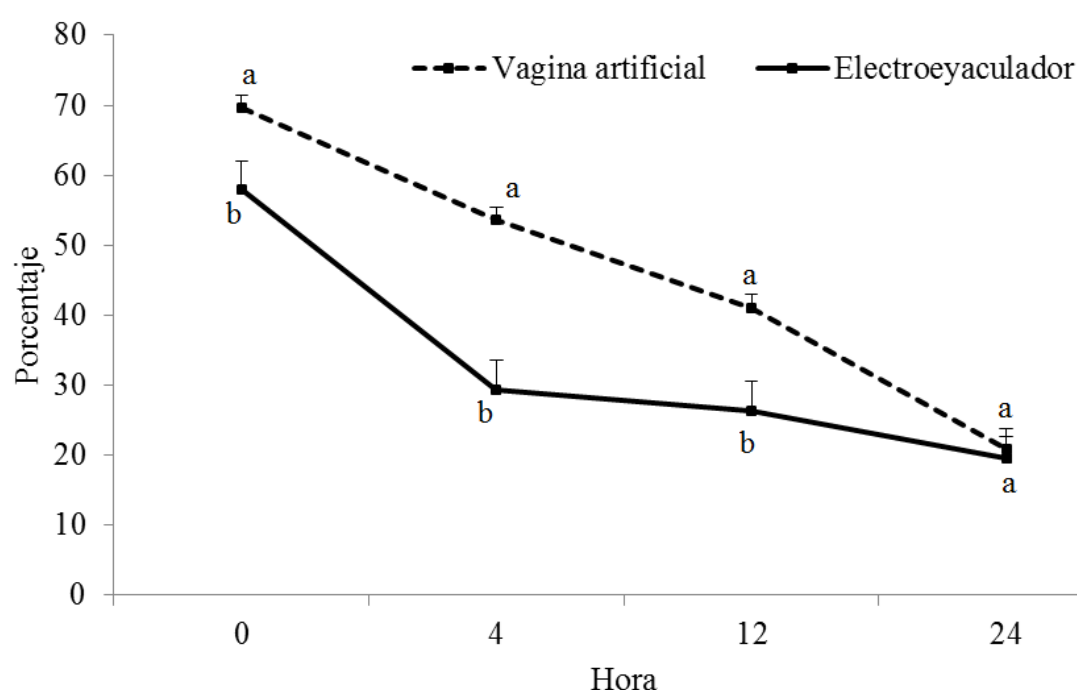


Figura 4: Porcentaje de motilidad progresiva en los distintos momentos de evaluación según los distintos métodos de colección.

Independientemente del método de colección utilizado se observa una caída en la motilidad individual a lo largo del tiempo. El vigor describió durante el período de observación una curva semejante a la variable analizada en la figura 4. La muestra obtenida mediante vagina artificial comenzó con un 70% de espermatozoides móviles y 4,0 puntos de vigor, mientras que la que se obtuvo con electroeyaculador inició con 3,5 puntos aproximadamente y un 60% de motilidad, dicha diferencia fue significativa ($p < 0,05$). En la segunda observación (4 horas) se nota un marcado descenso del semen obtenido mediante electroeyaculación. Los valores disminuyen alrededor de un 30% con menos de 2,5 de vigor. Contrariamente con el otro

método de colecta el descenso fue más paulatino arrojando valores cercanos al 60% y a 3,5. A las 12 horas ambos parámetros estudiados continúan disminuyendo, las diferencias permanecen siendo significativas. Las muestras obtenidas mediante vagina artificial presentaron una motilidad individual próxima a 50% y un vigor por debajo de 3,0, por otra parte los valores para la otra variable fueron entre 20 y 30% y 2,0. No se observan diferencias significativas ($p>0,05$) en el último período. Para ambas variables los valores se encontraron en el entorno de 20% y de 2,0.

Cuadro 4: Puntos de vigor en el período estudiado según método de colecta (media $\pm$ e.e.m.).

MÉTODO DE COLECTA	HORAS			
	0	4	12	24
Vagina artificial	4,0 $\pm$ 0,1 ^a	3,3 $\pm$ 0,1 ^a	2,5 $\pm$ 0,1 ^a	1,6 $\pm$ 0,1 ^a
Electroejaculación	3,7 $\pm$ 0,3 ^b	2,2 $\pm$ 0,3 ^b	2,0 $\pm$ 0,3 ^b	1,5 $\pm$ 0,3 ^b

DISCUSIÓN

Al evaluar el desempeño de distintos diluyentes para la conservación de semen refrigerado a 5 °C durante un período de 24 horas, se trató de eliminar cualquier efecto aditivo que interfiera con la objetividad de los resultados. Para esto el ensayo se realizó en plena estación reproductiva, lo que garantiza mejor producción espermática por parte de los animales. Se utilizaron distintas razas de carneros a modo de eliminar el efecto raza o justificar la variabilidad entre éstas, con el mismo fin se utilizaron distintos métodos de colecta. Se trabajó con un pool de tres eyaculados de individuos de una misma raza con el fin de eliminar el efecto individual y estandarizar las muestras (Paulenz y col., 2002). A modo de disminuir el error de la técnica se obtuvieron 2 eyaculados por animal.

El único test capaz de predecir con un 100% de eficacia el grado de fertilidad de un reproductor es el porcentaje de preñez resultante de su servicio natural o artificial llevado a cabo en hembras sanas y en condiciones normales. El otro método mucho más práctico pero no tan seguro es la evaluación del semen, incluyendo características macroscópicas y microscópicas. Excepcionalmente una buena valoración del semen, presenta luego una fertilidad reducida, por lo tanto se lo considera un método útil, rápido y eficaz para el diagnóstico de la fertilidad de un reproductor (Durán del Campo, 1980).

La capacidad fecundante de los espermatozoides está influenciada por una combinación de factores incluyendo la motilidad, viabilidad, capacidad de someterse a la capacitación y la reacción del acrosoma en el tracto reproductor femenino (Upreti y col., 1995). Nuestra investigación para evaluar el desempeño de los distintos diluyentes implicados, se centra principalmente en la capacidad para mantener la motilidad espermática del semen de carnero durante el enfriamiento a 5 °C por 24 horas. La evaluación de la motilidad individual se hace imprescindible al haber extendido la muestra en algún diluyente. Al mismo tiempo que se determina el porcentaje de motilidad espermática puede valorarse el tipo de movimiento o vigor para aportar datos que den consistencia a la evaluación.

Según Salamon y col. en 1990, las muestras de semen de muy buena o buena motilidad (clasificación 4 o 5) se pueden utilizar para inseminación artificial. Las muestras con valoración de 3 o menos pueden dar una fertilidad menor con lo que se aconseja desecharlas, teniendo en cuenta que conociendo la concentración del eyaculado se puede aumentar la dosis inseminante para mejorar los resultados. En este estudio se encontró una correlación muy positiva entre motilidad individual y vigor, es por eso que utilizamos la escala de vigor para

determinar a la muestra apta o no para inseminar. Maxwell y Salamon (1993), investigaron la preservación de semen de carnero en estado líquido y concluyeron que la fertilidad de los espermatozoides cae abruptamente luego de las 24 horas de almacenado al ser utilizado para la inseminación cervical. Sin embargo, si el mismo material es utilizado para inseminación intrauterina algunos espermatozoides mantienen su capacidad fecundante hasta por 10 días.

A medida que el tiempo de preservación transcurrió se observó una disminución en la motilidad a pesar del diluyente utilizado. No obstante, se logró visualizar una diferencia a favor del diluyente C que mantuvo mejores valores durante el período de observación. Estos resultados pueden estar explicados por la adición de yema de huevo que proporciona un mejor medio para el mantenimiento de la motilidad de las células a la vez de ser utilizado como protector de membrana. Esto difiere con lo descrito por Salamon y Robinson (1962) citado por Upreti en 1995, donde informaron que la dilución de semen de carnero en leche de vaca no reduce la capacidad fecundante y las comparaciones entre diluyentes a base de yema de huevo y leche como tal, revela que existe cierta superioridad a favor de la leche para el semen de esta especie. Como mencionamos anteriormente, Salamon y Maxwell (2000) señalan el agregado de yema de huevo (5%) a diluyentes en base a leche refuerza la acción protectora de éstos.

Otro factor al que se le pueden atribuir los buenos resultados del diluyente C, es la presencia de antibióticos en el mismo. Dadas las condiciones de trabajo, el semen suele contaminarse con microorganismos ambientales que alteran la calidad seminal, por lo tanto la conservación se ve afectada y es por eso importante la presencia de antibióticos en el diluyente.

Esto fue demostrado por Fierro en el 2005, donde probó que la leche descremada UHT con adición de yema de huevo al 5% y antibióticos mejora la calidad biológica del semen para la preservación a 5°C comparada con leche descremada UHT (sin antibióticos, ni yema de huevo). Sin embargo en este trabajo queda la incógnita si es la yema de huevo, o los antibióticos (o las dos juntas) las que demuestran la mejora en la preservación.

No se usó en el ensayo leche UHT con adición de yema de huevo o antibióticos, ya que perdería la justificación del uso de la leche, su fácil acceso y sin necesidad de preparación previa.

A su vez, las diferencias pueden justificarse por la capacidad buffer del TRIS. Paulenz y col. en 2002 han comparado el efecto buffer del citrato, leche y TRIS resultando superior en este último.

Por otra parte, no se encontraron diferencias en el desempeño de los diluyentes tras utilizar distintas razas. Es decir, tanto para las muestras obtenidas de carneros Corriedale como para las obtenidas de Milschaff, el diluyente A actuó de la misma manera en ambos casos, ocurriendo lo mismo con el B y con el C.

Respecto al método de colecta, en primer lugar cabe destacar que más allá del medio utilizado los extensores no varían su desempeño. Lo que más resalta es que a partir del tiempo 0 existe una diferencia de más de 10% entre ambos a favor de la vagina artificial. Esto puede verse explicado porque según Durán del Campo (1993) mediante la electroeyaculación se obtiene un mayor volumen, posiblemente contaminado con orina lo que lleva a un pH más elevado. También aumenta el riesgo de contaminación del material seminal debido a que la copa colectora se encuentra más expuesta al ambiente. De todas formas ambas muestras se consideran aptas para una inseminación artificial con semen fresco, lo que coincide con lo descrito por Marco-Jiménez y col. en 2005, los cuales describen que la calidad del semen fresco no se ve afectada significativamente por el método de colecta. En las primeras 4 horas de conservación la caída de motilidad individual y vigor en las muestras colectadas mediante electroeyaculador es muy marcada, ambos parámetros se encontraron por debajo de lo considerado apto para un programa de inseminación en cuanto a lo mencionado anteriormente según Salamon y col. en 1990. Sin embargo, el semen que se obtuvo con vagina artificial mantenía aun en la tercera observación valores aceptables.

De todas formas, Moor R.W. en 2011, saca en conclusión que la motilidad individual del semen obtenido por electroeyaculación es de baja repetitividad. Por lo que para sacar conclusiones acerca de la calidad seminal en cuanto a la motilidad se debe tomar un gran número de muestras, no basta un eyaculado para clasificar al semen. De lo contrario, concluye que la vagina artificial permite predecir con mayor certeza la calidad seminal debido a su mayor repetitividad. Esta baja repetitividad se ve exacerbada en aquellos electroeyaculadores manuales, debido a que las probabilidades de que las distintas colectas sean exactamente iguales disminuyen debido a errores del operador.

CONSIDERACIONES FINALES

- Considerando un programa de inseminación artificial con semen fresco se consideran aptos cualquiera de los tres diluyentes en estudio.
- No se encontraron diferencias en el desempeño de la leche descremada y la entera (ambas UHT). La única limitante de la leche entera es su difícil visualización a la hora de evaluar el semen.
- Tanto el diluyente A como el B, mantuvieron niveles aptos para una inseminación cervical por un corto período de tiempo. Pasadas las 4 horas la motilidad disminuye de manera que se dificultaría el pasaje de los espermatozoides a través del cérvix. Por esta razón, podría ser útil a la hora de una inseminación intrauterina, debiendo considerar los gastos que ésta implica y todo lo que el método conlleva.
- El diluyente C mantuvo la muestra apta por un período más prolongado de tiempo, lo que justificaría su uso cuando se necesita refrigerar el semen hasta 12 horas.
- Considerando lo antes mencionado, cabe destacar que frente a la necesidad de elección entre uno u otro diluyente, es necesario tener en cuenta que la leche UHT es de fácil acceso y de muy bajo costo en comparación con el Verde® -IMV, Francia-. A esto se le suma el hecho de que al comercial es necesario el agregado de yema de huevo fresco.
- La raza del macho no tiene influencia en el desempeño de los diluyentes.
- El método de colecta afecta la preservación del semen en el tiempo independientemente del extensor utilizado.
- El desempeño de los tres diluyentes se ve afectado de igual manera por el método de colección del semen.
- El semen extraído por vagina artificial puede ser utilizado para programas de inseminación tanto fresco como refrigerado hasta las 12 horas, sin embargo el obtenido mediante electroeyaculador podrá ser empleado únicamente en fresco.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Aisen E. (2004) Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires, Inter-Médica, 206p.
- 2- Bielli, A. (2002). Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea Editores, V. 1, 79-92.
- 3- Bosseau, S.; Brillard, J.P.;Marguant-Le Guienne, B.; Guerin, B.; Camus, A.; Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology 50:699-706.
- 4- Bustamante, G.; Duchateau, A. (2005). Examen de la salud reproductiva del macho. En: Galina C. Reproducción en animales domésticos. México D.F., Uteha Noriega editors, p. 169-175.
- 5- Cavestany, D. (1994). Procesamiento y congelación de semen de toro. Montevideo, Santa Catalina, 23 pp.
- 6- Delgadillo, J.A. (2004). Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor del macho. En: Aisen E. Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires, Inter-médica, p. 1-10.
- 7- Durán del Campo, A. (1980). Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur, 264 p.
- 8- Durán del Campo, A.; Cavestany, D.; Duran-Hontou, G. (1993). Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Agropecuaria Hemisferio Sur, 199 p.
- 9- Fernández Abella, D.; Bonilla Riera, C.; Bonilla Riera, R.; Villegas, N.; Ibáñez, W. (2001). Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5°C sobre el transporte espermático. Producción Ovina. 14: 55-63.
- 10-Fierro, S. (2005). Comportamiento de diferentes diluyentes en base a leche con adición de yema de huevo y glicerol para la preservación de semen de carnero refrigerado (5°C): Ensayos in vitro e in vivo en majadas de merino fino. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. 45 p
- 11-Frank, E. (2004). Manejo reproductivo para producción de fibra. En: Aisen E. Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires, Inter-médica, p. 25-42.

- 12-García, MA; Graham, EF. (1987). Dialysis of bovine semen and its effects on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology*, 24:446-454.
- 13-Gil, J. (2002). El espermatozoide desde la espermiación hasta la fecundación. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea Editores, V. 1, p. 93-111.
- 14-Gil, J. (2002). Preservación de semen ovino. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea, V. 2, p. 365-385.
- 15-Gil, J.; Lundeheim, N.; Söderquist, L.; Rodríguez-Martínez, H. (2003). Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59: 1241-1255.
- 16-Gil, J.; Olivera, J. (2005). Preservación (Refrigeración y congelación) de semen ovino y su uso en la inseminación artificial cervical. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p 55-67.
- 17-Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11: 73-88.
- 18-Harper, MJK. (1994). Gamete and zygote transport. En: Knobil, E.; Neill, D.J. The physiology of reproduction. New York, Raven, V.1, 3296 p.
- 19-Jones, RC; Foote, RH. (1972). Nondialyzable skim milk in diluents for ram and bull semen. *Journal of Dairy Science*, 55: 856-861
- 20-Mann, T. (1974). Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility* 37: 179-188.
- 21-Marco-Jiménez F., Puchades S., Gadea J., Vicente J.S., Viudes-de-Castro M.P. (2005). Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1756-1765.
- 22-Maxwell, W.; Salamon, S. (1993). Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction, Fertility and Development*; 5: 613-638.
- 23-Maxwell, W.; Watson, P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* 42: 55-65.
- 24-McLachlan, RI; Wreford, NG; Robertson, DM; de Kretser, DM. (1995). Hormonal control of spermatogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 6: 95-101.
- 25-MGAP-DICOSE. Datos de la declaración jurada de DICOSE 2012. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE> Fecha de consulta: 12/11/2014.

- 26-MGAP-DIEA. Anuario estadístico 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2013,O,es,0>, Fecha de consulta: 12/11/2014.
- 27-Moor M.W. (2011). A comparison of electro-ejaculation with the artificial vagina for ram semen collection. Hamilton, New Zealand Veterinary Journal, 33:3, 22-23.
- 28-Paulenz, H.; Söderquist, L.; Pérez-Pé, R.; Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology 57: 823-836.
- 29-Salamon, S.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, Ed. Acribia, 192pp.
- 30-Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science 37: 185-249.
- 31-Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. Animal Reproduction Science 62: 77-111.
- 32-SUL (Secretariado Uruguayo de la Lana). Disponible en: <http://www.sul.org.uy>. Fecha de consulta: 12/11/2014.
- 33-SUL. (2011) Manual práctico de Producción Ovina. Montevideo, SUL, 221 p.
- 34-Upreti, G.C.; Oliver, J.E.; Duganzich, D.M.; Munday, R.; Smith, J.F. (1995). Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). Animal Reproduction Science 37: 143-157.
- 35-Watson, P.F.; Martin, I.C. (1976). Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. Theriogenology. 6: 559-564.
- 36-Windsor, DP. (1997). Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. Animal Reproduction Science 47: 21-29.