

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**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 MERINO FINO**

Por

Br. Sergio Andrés FIERRO FERNÁNDEZ



TRABAJO FINAL presentado como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.
(Orientación Producción Animal)

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

020 TG
Comportamiento
Fierro Fernández, Sergio Andrés

FV/26482

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Dr. PhD. Daniel Cavestany

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. PhD. Julio Olivera Muzante

Tercer Miembro:

Ing. Agr. PhD. Daniel Fernández Abella

Cotutor:

Dr. PhD. Jorge Gil Laureiro

Fecha:

5 de Octubre de 2005

Autor:

Sergio Andrés Fierro Fernández

Esta tesis está dedicada a:

- **“La abuela chicha”**: mi abuela, pilar insustituible de mi vida. No hay palabras que puedan expresar lo que tú significas para mí. Tu dedicación y esfuerzo hacia mí han sido constantes desde que yo llegué a este mundo. Mi logro de llegar a ser Veterinario es resultado de tu cariño, tu comprensión y tu apoyo.
- A **mamá**: porque siempre me has apoyado, tu tesón y ganas de ir siempre hacia adelante son un ejemplo invaluable. Esta es una forma de reconocer ciertos errores que cometí quizás por mis pocos años y pedir perdón por no haberte comprendido y apoyado en momentos muy difíciles para ti.
- A Mariana, **“La Monosita”**, mi compañera, mi amiga, mi novia, mi amor. Haz soportado las lejanías y mi devoción por la especie ovina. Tu apoyo incondicional, tu forma de ser y ver las cosas, tu paciencia, tu comprensión, son algunas de tus cualidades que hacen de ti una persona maravillosa. TU AMOR: la razón de mi existir.
- A **papá**: porque me has acompañado a tu manera. Tus enseñanzas son pequeñas–grandes cosas que me ayudan a crecer.

AGRADECIMIENTOS

- A mis tutores y amigos los Dres. Julio Olivera Muzante “el pájaro” y Jorge Gil “el yuyo”, por las extensas horas dedicadas a ésta tesis y por formar parte de mi familia Sanducera, quien desde el momento que llegué a Paysandú me ayudaron a crecer como persona y a progresar como futuro Veterinario.
- Al “viejo” Dr. Alfredo Ferraris, porque desde que llegué a Paysandú el fue el primero que me recibió y estuvo siempre que lo necesité. Han sido muchas horas de compartir, de conversar y de aprender junto a ti. “viejo” tus enseñanzas van más allá de lo curricular y de lo planeado, tú enseñas “vida”.
- A la familia Filliol-Barreiro y a todo el personal de campo del establecimiento “Piedra Mora”, por su hospitalidad durante la realización de la tesis.
- A la Regional Noroeste del Laboratorio Miguel C. Rubino ,DILAVE, por permitir la utilización de su infraestructura y por hacerme sentir uno más del equipo.
- A la Facultad de Veterinaria en especial a todos los docentes del ex PLAPIPA, hoy formando parte de la orientación Producción Animal, y con gran énfasis al Dr. Marcelo Rodríguez, por las extensas horas de compañía en la oficina.
- A todos los funcionarios de la EEMAC, Estación Experimental Mario A. Cassinoni, en especial al Sr. Juan Arévalo “el Chilo” y al Sr. Ignacio Arévalo “el Pancho”, por compartir extensas horas de amistad y trabajo, y por ser mis “maestros” en muchos temas que en los libros no están.
- Al Dr. Santos Gama, por la colaboración durante la Fase “in vitro” y al PhD. Edgardo Rubianes, por la realización de las ecografías.
- Al Ing. Agr. Oscar Bentancur, por la colaboración en la realización del análisis estadístico.
- A la sección publicaciones de la EEMAC, por los servicios prestados.
- A mis compañeros de pabellón los “Agrónomos”: Daniel Rocha, Ignacio Russi, Victoria Gestido, Carolina Carballo, Gabriela Sánchez, Ileana Avila, Martín Docarmo; Leonardo Gabard, Héctor Rodríguez, David Silveira, por su compañía y amistad durante éste año y medio en la EEMAC.
- A mis colegas y amigos Pedro Camacho, Juan Manzano, Agustín Saa, Federico Olariaga, Pedro García Ramos, Javier Núñez y Diego Pioli por los momentos vividos y por su apoyo durante la realización de ésta tesis.
- A todos los integrantes del grupo Producción 2003, por el inolvidable año que pasamos juntos.

| | |
|--|----------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | IV |
| | |
| 1. <u>RESUMEN (SUMMARY)</u> | 1 |
| | |
| 2. <u>INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</u> | 2 |
| | |
| 3. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 4 |
| 3.1 <u>ESTRATEGIAS DE PRESERVACIÓN SEMINAL</u> | 4 |
| 3.1.1 <u>Preservación Líquida</u> | 4 |
| 3.1.2 <u>Preservación a Temperaturas bajo cero grado centígrado</u> | 4 |
| 3.2 <u>DILUYENTES ó EXTENSORES SEMINALES</u> | 5 |
| 3.2.1 <u>Diluyentes naturales utilizados en la dilución de semen para almacenado líquido</u> | 7 |
| 3.2.1.1 <u>Diluyentes en base a Leche</u> | 7 |
| 3.2.1.2 <u>Diluyentes en otras bases</u> | 7 |
| 3.3.1 <u>Diluyentes sintéticos utilizados en la dilución de semen para almacenado líquido</u> | 8 |
| 3.3.1.1 <u>Diluyentes en base a TRIS (hidroxymetil amino metano)</u> | 8 |
| 3.3.1.2 <u>Diluyentes en base a Citrato</u> | 8 |
| 3.4 <u>AGENTES UTILIZADOS PARA LA PROTECCIÓN DEL SEMEN DURANTE EL PROCESO DE ENFRIAMIENTO Y ALMACENAMIENTO</u> | 8 |
| 3.4.1 <u>Yema de Huevo de Gallina</u> | 8 |
| 3.4.2 <u>Glicerol</u> | 10 |
| 3.4.3 <u>Otras Sustancias con acción Crioprotectoras</u> | 10 |
| 3.5 <u>OTRAS ESTRATEGIAS PARA LA PROTECCIÓN DEL SEMEN ALMACENADO LÍQUIDO</u> | 11 |
| 3.6 <u>FERTILIDAD DEL SEMEN PRESERVADO LÍQUIDO</u> | 11 |
| 3.7 <u>PRINCIPALES CAUSAS DE LA DISMINUCIÓN DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN ALMACENADO LÍQUIDO</u> | 13 |
| 3.7.1 <u>Anatomía Cervical</u> | 13 |
| 3.7.2 <u>Alteración de la Motilidad</u> | 14 |
| 3.7.3 <u>Alteración de la Actividad Respiratoria</u> | 14 |
| 3.7.4 <u>Capacitación Acelerada</u> | 14 |
| 3.7.5 <u>Alteración en la interacción con las Células Epiteliales del Oviducto</u> | 15 |
| 3.7.6 <u>Alteración del Desarrollo Embrionario. Muerte Embrionaria</u> | 15 |
| 3.8 <u>TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN SEMINAL</u> | 16 |
| 3.8.1 <u>Motilidad Subjetiva</u> | 16 |
| 3.8.2 <u>Integridad de Membrana</u> | 17 |
| 3.8.3 <u>Estado de Capacitación Espermática</u> | 17 |

| | |
|---|----|
| 4. <u>MATERIALES Y METODOS</u> | 18 |
| 4.1 FASE 1 (estudios in vitro) | 18 |
| 4.1.1 <u>Animales</u> | 18 |
| 4.1.2 <u>Manejo del semen</u> | 18 |
| 4.1.2.1 Extracción y evaluación seminal..... | 18 |
| 4.1.2.2 Formación del pool de semen | 19 |
| 4.1.2.3 Formación de alícuotas y dilución | 19 |
| 4.1.3 <u>Diluyentes</u> | 19 |
| 4.1.4 <u>Preservación del semen diluido</u> | 20 |
| 4.1.5 <u>Evaluación del semen preservado</u> | 20 |
| 4.1.6 <u>Pruebas de Laboratorio</u> | 21 |
| 4.1.6.1 Motilidad Espermática Subjetiva | 21 |
| 4.1.6.2 Integridad de Membrana | 21 |
| 4.1.6.3 Estado de Capacitación Espermática | 21 |
| 4.1.7 <u>Diseño Experimental</u> | 22 |
| 4.1.8 <u>Análisis Estadístico</u> | 22 |
| 4.2 FASE 2 (estudios in vivo) | 24 |
| 4.2.1 <u>Animales</u> | 24 |
| 4.2.2 <u>Extracción, formación del pool y dilución seminal</u> | 24 |
| 4.2.3 <u>Diluyentes</u> | 24 |
| 4.2.4 <u>Preservación del semen diluido y manejo pre inseminación</u> | 24 |
| 4.2.5 <u>Manejo de la Inseminación Artificial</u> | 25 |
| 4.2.6 <u>Diseño experimental</u> | 25 |
| 4.2.7 <u>Análisis estadístico</u> | 25 |
| 4.3.1 <u>Relación "IN VITRO-IN VIVO"</u> | 26 |
| 4.3.1.1 Análisis estadístico | 26 |
| 5. <u>RESULTADOS</u> | 27 |
| 6. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u> | 34 |
| 7. <u>CONCLUSIONES</u> | 38 |
| 8. <u>CONSIDERACIÓN FINAL</u> | 38 |
| 9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 39 |
| 10. <u>ANEXOS</u> | 44 |
| 10.1 DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO | 45 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----------------|
| Cuadro I. Fertilidad de diferentes diluyentes a temperatura de refrigeración (4-5°C)... | 12 |
| Cuadro II. Organigrama FASE 1 (estudios in vitro) | Anexos..... 44 |
| Cuadro III. Organigrama FASE 2 (estudios in vivo) | Anexos..... 45 |
| Cuadro IV. Efecto de 11 diluyentes de semen de carnero a 5°C sobre la Motilidad espermática evaluada hasta las 72 horas (% , medias de mínimos cuadrados ± ee)..... | 28 |
| Cuadro V. Efecto de 11 diluyentes de semen de carnero a 5°C sobre la Integridad de Membrana Espermática (% , medias ajustadas)..... | 29 |
| Cuadro VI. Efecto del momento de preservación sobre la Integridad de Membrana Espermática (% , medias ajustadas)..... | 30 |
| Cuadro VII. Efecto de 11 diluyentes de semen de carnero a 5°C sobre la No Capacitación espermática (millones de espermatozoides, media de mínimos cuadrados)..... | 31 |
| Cuadro VIII. Efecto del momento de preservación sobre la No Capacitación espermática (millones de espermatozoides, media de mínimos cuadrados)..... | 32 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura I. Diseño Experimental Fase 1 “in vitro” | 23 |
| Figura II. Evolución de la Motilidad espermática de 11 diluyentes de semen de carnero en cinco momentos de preservación a 5°C (medias en % de mótilos)..... | 27 |
| Figura III. Evolución de la Integridad de Membrana de 11 diluyentes de semen de canero en cinco momentos de preservación a 5°C (medias en %)..... | 29 |
| Figura IV. Evolución de la No Capacitación Espermática de 11 diluyentes de semen de carnero en cinco momentos de preservación a 5°C (millones de espermatozoides)..... | 31 |
| Figura V. Fertilidad según diluyente de preservación de semen de carnero a 5°C a los 30 días post IA (%)..... | 33 |

1. RESUMEN

Se evaluaron *in vitro* once diluyentes en base a leche para preservar semen de carnero a 5°C por 0, 12, 24, 48 y 72 horas. A partir de tres parámetros seminales (Motilidad subjetiva, Integridad de membrana y Capacitación espermática), cinco de ellos fueron seleccionados para ser comparados *in vivo* tras 24 horas a 5°C (fertilidad a inseminación artificial vía cervical). Todos los tratamientos de semen preservado a 5°C obtuvieron menor fertilidad que el grupo Control (semen diluido sin preservación). No hubo diferencias significativas de fertilidad entre los diluyentes leche UHT 5% yema 2% glicerol, leche UHT 5% yema, INRA 96® 5% yema 2% glicerol e INRA 96® 5% yema (58, 52, 58 y 56%, respectivamente) ($P>0.05$). La fertilidad del diluyente FISER 20% yema no fue diferente al UHT 5% yema, pero fue significativamente menor al resto de los diluyentes ($P<0.05$). La asociación de yema y glicerol no generó mejor fertilidad respecto al uso de yema de huevo sola como aditivo. Los diluyentes que presentaron mejor performance *in vitro* fueron superiores *in vivo*.

SUMMARY

Eleven milk based extenders for ram semen preservation at 5°C for 0, 12, 24, 48 and 72 hours were assessed in-vitro. Five extenders were selected for evaluation under field conditions (cervical insemination) after 24 hours at 5°C. All the chilled extenders showed lower fertility than control group (fresh diluted semen). No significant difference was found between extenders UHT-5% yolk-2 % glycerol, UHT-5% yolk, INRA96®-5% yolk-2 % glycerol and INRA96®-5% yolk (58, 52, 58, y 56 % respectively). FISER-20% yolk extender had not statistical difference in fertility with UHT-5% yolk; however it showed lower fertility compared with all the others extenders tested in-vivo. Extenders, who demonstrated better behavior in-vitro, were better under field conditions. Storage of ram semen at chilled temperatures (5°C) produced lower fertility compared with fresh semen. The associated additives, egg yolk and glycerol, did not produce better pregnancy rates compared with egg yolk as the only additive.



2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En la última década el stock ovino nacional experimentó un marcado descenso, alcanzando en el año 2004 un total de 9.8 millones de ovinos (DICOSE). Esta situación ha sido determinada principalmente por una pronunciada y mantenida baja en los precios de la lana en el ámbito internacional (Salgado, 2004). No obstante, ingresaron al país en el período noviembre 2004 – mayo 2005, 150 millones de dólares por concepto de exportaciones del rubro ovino, siendo la lana y sus derivados, el sub rubro que permitió el mayor ingreso de divisas al país (74% de las exportaciones de productos ovinos) (SUL). Revertida aquella situación de mercado, los productores hoy en día apuestan a estabilizar y aumentar el stock ovino y aumentar así los ingresos de este rubro.

No ajenos a este contexto nacional, se encuentran los establecimientos ganaderos sobre suelos de Basalto, predominantes en vastas zonas del Litoral Norte del país (Artigas, Salto, Paysandú y Tacuarembó, entre otros). Es en estos predios en los que se ha promovido la alternativa de producción de lanas finas, por medio de un programa de mejora genética que impulsa el proyecto de “Producción de Lanas Finas y Superfinas en el Uruguay” (Montossi y col., 1998; Proyecto Sociedad Criadores de Merino Australiano del Uruguay-SUL-INIA). Actualmente, se promueve a partir de un Núcleo de elite y varios Planteles la generación de carneros objetivamente superiores en finura, para proporcionar padres certificados a las majadas multiplicadoras y generales (SCMAU-SUL-INIA-MGAP, 2004).

El progreso genético a alcanzar en este programa está estrechamente ligado a la difusión de genes en la majada general, y al intervalo generacional entre los carneros padres utilizados en los planteles de elite y sus hijos en las majadas multiplicadoras y comerciales. Los carneros involucrados pasan por períodos de intensa actividad, e incluso bajo determinadas circunstancias son trasladados en forma sucesiva a diferentes establecimientos a efectos de cumplir con los servicios necesarios. Estos carneros deben soportar condiciones de estrés tales como transporte, cambios de ambiente, de alimentación y otros, que en muchas ocasiones se tornan perjudiciales para la calidad seminal interfiriendo con el objetivo buscado. Estos traslados son también un riesgo físico para el reproductor, además del riesgo sanitario implícito en el movimiento de animales entre predios.

Las tecnologías disponibles para favorecer el desarrollo de un programa genético tienen por base a la inseminación artificial (IA). La IA, es el método de reproducción en el que los gametos masculinos son transportados al tracto genital femenino a través de medios mecánicos, que sustituyen los órganos especializados del macho (Durán del Campo, 1980). Es una técnica cuya ventaja fundamental, es la posibilidad de incrementar notoriamente la cantidad de hembras que puedan gestarse con un solo reproductor. La necesidad de fertilizar un elevado número de hembras con semen de un carnero mejorador, requiere en algunas circunstancias, del transporte del semen desde el sitio de extracción a un lugar de inseminación distante. La supervivencia de los espermatozoides eyaculados en el plasma seminal solo se limita a pocas horas (Hafez, 1996). Ello, sumado a la necesidad del uso de los carneros por largos períodos, o en

diferentes épocas del año, conlleva a la necesidad de profundizar en la investigación sobre el almacenamiento de semen bajo condiciones artificiales. Las tecnologías disponibles para almacenar el material seminal se basan en la preservación del semen por períodos breves (semen refrigerado), o por períodos más largos (semen congelado). En éste marco, se desarrolla desde el año 2004 el proyecto CSIC de Vinculación con el Sector Productivo (UdelaR), denominado “Implementación de protocolos de preservación de semen de carnero y su fertilidad vía inseminación cervical en majadas del Programa Merino Fino”.

La utilización de la IA cervical (ampliamente difundida en el país), en conjunto con la preservación seminal líquida refrigerada (4 a 8°C), constituyen dos herramientas fundamentales para alcanzar los objetivos de los programas genéticos. No obstante, su aplicación y éxito dependerá de estudios previos en cuanto a la fertilidad esperada mediante el uso de diferentes diluyentes para tal fin. El estudio de la fertilidad medida directamente sobre una majada, constituye un resultado con variables aditivas no inherentes al proceso de refrigeración y preservación tales como el clima, raza, edad, alimentación, además de elevados costos. Por lo tanto, estos estudios deberán basarse en resultados de evaluaciones previas a nivel de laboratorio de diferentes parámetros seminales correlacionados en forma positiva con la fertilidad. Se llegará de ésta manera a definir los diluyentes y agregados necesarios para preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides almacenados bajo la forma líquida.

En éste contexto se definen los objetivos generales y específicos del trabajo.

El objetivo general de trabajo fue:

Estudiar el efecto de diversos diluyentes de preservación del semen de carnero a 5°C sobre la calidad espermática y sobre la fertilidad cuando se utiliza la IA vía cervical.

Los objetivos específicos fueron:

1) Implementar y comparar el efecto sobre la calidad espermática (estudios “*in vitro*”), de diferentes diluyentes en base a leche con el agregado de yema de huevo, glicerol y su asociación, para la preservación de semen de carnero a 5°C, mediante la evaluación de tres parámetros seminales: motilidad subjetiva, integridad de membrana y estado de capacitación espermática.

2) Evaluar la fertilidad vía cervical (estudios “*in vivo*”), de los protocolos que presenten mejor comportamiento a la evaluación *in vitro*, en las condiciones de producción ovina características del Basalto.

3) Definir la correlación observada entre los estudios “*in vitro*” (parámetros seminales) y los estudios “*in vivo*” (fertilidad).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESTRATEGIAS DE PRESERVACIÓN SEMINAL

El objetivo primario de preservar el semen es poder dilatar el período entre la extracción seminal y su deposición en el tracto genital femenino, posibilitando así el traslado de los gametos masculinos a lugares distantes, sin afectar el potencial fecundante de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1987; Gil, 2002^b).

Se han desarrollado dos estrategias de preservación del material seminal:

A) preservación líquida

B) preservación a temperaturas bajo cero grado centígrado

Ambas estrategias de preservación, se basan en la disminución o inhibición en forma reversible del metabolismo espermático, evitando de esa manera el agotamiento de recursos energéticos y la formación de productos finales tóxicos del propio metabolismo de los espermatozoides.

3.1.1 La preservación líquida implica a los métodos que no modifican el estado de fase. Se pueden subdividir en: conservación a bajas temperaturas (4–8°C semen refrigerado), y conservación a temperatura ambiente (18°C, semen enfriado). Esta forma de preservación permite mantener la viabilidad del material seminal con menores costos con respecto a la preservación congelada. No obstante, a medida que el tiempo de preservación aumenta, la fertilidad posterior a la IA disminuye (Salamon y Maxwell, 2000), debido a que los espermatozoides experimentan cambios que determinan una menor vida media (Maxwell y Watson, 1996).

3.1.2 La preservación a temperaturas bajo cero grado (denominada congelación), es una técnica altamente desarrollada en los bovinos. No obstante, genera en el ovino severas modificaciones a nivel espermático que hacen que los espermatozoides tengan un limitado progreso a través de la barrera cervical. Es esta barrera, el principal obstáculo anatómico para que los espermatozoides congelados–descongelados puedan alcanzar buenos niveles de fertilidad. Azzarini y Valledor (1988), obtuvieron baja fertilidad vía cervical logrando buenos resultados inseminando con semen congelado vía intrauterina (5.6 y 8%, 52.9 y 43.2%; borregas y ovejas, IA cervical e intrauterina, respectivamente). Otros investigadores a nivel nacional obtuvieron en ovejas multíparas bajo otras circunstancias, 28.4 % de preñez por ultrasonografía a los 50 días de la última oveja inseminada vía cervical (Gil y col., 2003a).

3.2 DILUYENTES o EXTENSORES SEMINALES

Con el objetivo de mantener a los espermatozoides viables durante períodos más prolongados es necesaria su dilución o extensión con una solución protectora. Los **diluyentes o extensores seminales** son un conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen; posibilitando el procesamiento de un número previamente establecido de espermatozoides y su almacenamiento hasta la inseminación. Estas sustancias deben cumplir con una serie de funciones a enumerar:

I. Proveer nutrientes (energía) a la célula espermática

Los **sustratos energéticos** son esenciales para mantener la motilidad espermática y el propio metabolismo celular. La fructosa, único carbohidrato simple presente en el plasma seminal del carnero, es el principal sustrato (aportado por las vesículas seminales). La glucosa y la manosa, también pueden ser metabolizadas por los espermatozoides (Maxwell y Salamon, 1993). No obstante, las membranas de la célula espermática son más permeables a la glucosa que a la fructosa (Foote, 1984). Otros carbohidratos como la sucrosa y la lactosa no participan como sustratos energéticos, y su utilidad, es la de intervenir en el mantenimiento de la presión osmótica extracelular, y proteger la integridad de las membranas durante el almacenamiento (Salamon y Maxwell, 2000). En ausencia de sustratos energéticos, la célula espermática oxida fosfolípidos intracelulares, generando productos finales nocivos para la integridad celular (Foote, 1984).

II. Poseer poder buffer y pH óptimo

El pH del semen de carnero es de 6.8 (Durán del Campo y col., 1993). Cuando el semen líquido es almacenado a 5°C por varios días, suficiente ácido láctico es producido para disminuir ese pH significativamente (Foote, 1984). El mantenimiento del pH del medio de dilución dentro del rango de tolerancia espermática (6.5 – 7.5) es crítico, y se logra mediante el uso de buffers. Los **buffers** se clasifican en orgánicos e inorgánicos. Los orgánicos, representados por el Tris (hidroximetil amino metano), Tes [N-Tris (hidroximetil) metilamino etano-ácido sulfónico], Hepes [N-2-hidroxietil piperazina-N-2-ácido etanosulfónico], Mes [2 (N-morfolino) ácido etanosulfónico], Pipes (piperazina-N, N-bis), y Mops [3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico], presentan mayor capacidad tampón que los fosfatos y citratos (buffers inorgánicos), actúan intracelularmente, y ante cambios de pH, incrementan la tolerancia al aumento intracelular de cationes monovalentes y frecuentemente aumentan la tonicidad del diluyente (Salamon y Maxwell, 2000).

Según estudios de Lafluf y col. (1990), el pH extracelular ácido provocó entecimiento del batido flagelar, sin disminuir el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. No hubo efecto deletéreo sobre la integridad de membranas o acrosomas, logrando una fertilidad mayor al usar un diluyente con pH 6.3 vs 7.2 (58 vs 31 % de no retorno, respectivamente). Sin embargo, otros estudios a nivel nacional (Fernández Abella y col., 1998) informan de una mejoría en la supervivencia

espermática al aumentar el pH del diluyente hasta valores cercanos y mayores de 7.

III. Ser isotónicos

Deben mantener una presión osmótica estable y balance hídrico adecuado.

IV. Inhibir el crecimiento bacteriano

El desarrollo de bacterias en el semen es perjudicial para la sobre vivencia espermática (Foote, 1984). Los microorganismos están presentes en todo eyaculado por lo cual es importante un control eficiente de los mismos, evitando su introducción en animales individuales, establecimientos o áreas libres (Thibier y Guerin, 2000). La proliferación de contaminantes microbiológicos patógenos, así como la flora saprofita de las vías reproductivas, es controlada mediante el uso de antibióticos. Una combinación de penicilina (500 a 1000 UI/ml) y estreptomicina (500 a 1000 ug/ml), proporciona amplio espectro antibacteriano (Hafez, 1996; Durán del Campo y col., 1993).

V. Aumentar el volumen del semen

De ésta manera permite ajustar la concentración y volumen de la dosis (Durán de Campo y col. 1993; Gil y Olivera, 2005)

VI. Proteger a la célula espermática del efecto nocivo del frío

Cuando se produce el descenso de temperatura a 5°C los espermatozoides sufren el denominado choque de frío, choque térmico o "cold shock". La susceptibilidad de los espermatozoides al choque térmico está ligado a la relación de ácidos grasos no saturados – saturados y a un bajo contenido de colesterol, lo cual crea una menor estabilidad a nivel de la membrana espermática (White, 1993). Se generan cambios a nivel de la membrana plasmática y membranas de organelos, provocándose transición de fase de los lípidos estructurales de las membranas, alterándose su fluidez y permeabilidad selectiva (Hammerstedt y col., 1990; Drobnis, y col., 1993) quedando los espermatozoides en un estado de capacitación avanzado, similar al de la capacitación fisiológica (Maxwell y Watson, 1996; Watson, 2000). Los efectos detrimentales de éste fenómeno se minimizan mediante el enfriamiento gradual del semen en 1.5 a 2 h (Evans y Maxwell, 1987), y por la adición de lípidos en el diluyente (Maxwell y Salamon, 1993), lecitinas, proteínas y lipoproteínas (Cavestany, 1994).

3.2.1 Diluyentes naturales utilizados en la dilución del semen para el almacenado líquido

3.2.1.1 Diluyentes en base a Leche

El comienzo del uso de la leche como diluyente de semen data del año 1930 por parte de investigadores rusos (Bonadonna, 1986). La fracción proteica 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
- proteger los espermatozoides durante la reducción de temperatura.

Se prefiere el uso de leche de vaca a la de otras especies. La leche entera, descremada o reconstituida, han sido utilizadas con previo calentamiento a 92–95°C por 8 a 10 minutos (no se debe hervir), con el fin de inactivar las lacteninas de la fracción proteica. La leche UHT es la más usada. Presenta las ventajas de no requerir calentamiento y ser estéril (Evans y Maxwell, 1987; Maxwell y Salamon, 1993; Salamon y Maxwell, 2000).

Existen en la actualidad diluyentes en base a leche, tales como el INRA 96® y el Fiser (Fiser y Langford, 1981). El diluyente INRA 96® (IMV Technologies; L'AIGLE, France) es un diluyente comercial en base a leche, para preservación de semen de equino a temperaturas de entre 4 y 15°C, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Se han obtenido en esta especie resultados de 57 % de fertilidad a la IA con semen diluido en INRA 96 y preservado a 15°C por 24 horas (Decuadro-Hanzen y col., 2001).

El diluyente Fiser (Fiser y Langford, 1981), es un diluyente en base a leche descremada reconstituida, citrato trisódico y pentobarbital. Investigadores a nivel nacional han variado su constitución denominándolo "Fiser modificado", adicionándole 21.3 % (v/v) de yema de huevo de gallina (Fernández Abella y col., 1998).

3.2.1.2 Diluyentes en otras bases

Otras sustancias naturales han sido utilizadas para la dilución de 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., 1998).

3.3.1 Diluyentes sintéticos utilizados en la dilución del semen para el almacenado líquido

3.3.1.1 Diluyentes en base a TRIS (hydroxymetil amino metano)

El Tris es el principal componente estudiado de los diluyentes para almacenaje de semen. Concentraciones de 10 a 50 mM presentan bajo o nulo efecto sobre motilidad y metabolismo del espermatozoide de carnero. No obstante concentraciones superiores fueron reportadas como ventajosas para el almacenaje de semen líquido (Maxwell y Salamon, 1993; Salamon y Maxwell, 2000). Evans y Maxwell (1987), describen y recomiendan para la dilución de semen de carnero un diluyente en base a Tris, con el agregado de ácido cítrico (como anti oxidante), fructosa (como fuente de energía), yema de huevo (como protector ante choque térmico), agua destilada y antibióticos.

3.3.1.2 Diluyentes en base a Citrato

El citrato es un buffer inorgánico, altamente utilizado en los diluyentes sintéticos. Evans y Maxwell (1987), describen un diluyente sintético para semen de carnero en base a citrato de sodio, glucosa (como fuente de energía), yema de huevo y agua destilada.

3.4 AGENTES UTILIZADOS PARA LA PROTECCIÓN DEL SEMEN DURANTE EL PROCESO DE ENFRIAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

3.4.1 Yema de huevo de gallina

El descubrimiento de su efecto crioprotector en los diluyentes de semen se origina en estudios llevados a cabo por Phillips en 1939. Los huevos de gallina a utilizar deben ser frescos (no más de 4 o 5 días) (Evans y Maxwell, 1987).

Los fosfolípidos de la fracción lipoproteica de baja densidad (LDF) de la yema de huevo son los componentes que proveen protección a la membrana celular, mientras que las proteínas de esa fracción actúan estabilizando los lípidos y fijándolos a la membrana celular (Pace y Graham, 1974; Watson, 1981).

Los fosfolípidos de la LDF fueron más efectivos en los estudios de almacenamiento de semen, respecto a la adición de fosfolípidos exógenos (Kampschmidt y col., 1953, citado por Watson, 1981). No obstante los liposomas de la lecitina, en contraste con los fosfolípidos de la LDF, proveen igual protección durante el choque de frío (Watson, 1981).

Según Salamon y Maxwell (2000), los efectos de la yema de huevo son:

- proveer protección ante el choque de frío ("cold shock")
- prevenir cambios degenerativos a nivel del acrosoma
- reducir la pérdida de enzimas acrosomales durante el almacenamiento líquido.
- actuar como antioxidante (Maxwell y Stojanov, 1996)
- prevenir el aumento del ingreso de Ca^+ al espermatozoide (quelante) (White, 1993)
- aportar glucosa como sustrato energético (Durán del Campo y col., 1993)
- actuar como factor capacitante (Ijaz y col., 1989)

Según Pace y Graham (1974), ningún diluyente es capaz de proteger la célula espermática ante la injuria del enfriamiento y congelamiento en ausencia de yema de huevo. Sin embargo, su utilización tanto en bajo como en alto porcentaje debe ser evitada. Su adición entre 1 a 2 % al semen de toro descongelado genera depresión de la motilidad espermática, mientras que porcentajes entre 16 y 32 % genera disminución de acrosomas intactos (Smith y col., 1978). Jones y Martín (1973) (citado por Maxwell y Salamon, 1993), reportan que la inclusión de 3 % de yema de huevo en un diluyente a base de glucosa-fosfato almacenando semen a 5°C por 72 horas, reduce la frecuencia de cambios en el acrosoma y pieza media. Watson y Martín (1976), obtienen menor fertilidad al usar semen almacenado con un 6 % de yema de huevo, en comparación con un diluyente con 1.5 % de yema de huevo. Esto concuerda con la sugerencia de Colas y col. (1968) (ver Maxwell y Salamon, 1993), de que altos porcentajes de yema de huevo en diluyentes para almacenaje de semen líquido, generan detrimento en la fertilidad. Gil y col. (2003b), reportan que el uso de porcentajes de yema de huevo mayores a 5% en diluyentes en base a leche para semen de carnero, no generan mejores resultados en cuanto a motilidad y espermatozoides no capacitados. No obstante, los resultados de integridad de membrana espermática presentaron un aumento significativo al usar 10% de yema de huevo. Todos los parámetros seminales decrecieron a medida que los porcentajes de yema de huevo aumentaron a valores por encima de 10 %.

La gran variabilidad de su composición, la potencialidad de portar residuos medicamentosos y microorganismos resistentes a los antibióticos utilizados en los diluyentes, son factores que han determinado la búsqueda de diluyentes químicamente definidos y libres de yema de huevo (Müller-Schlösser, 2005). En este contexto se han utilizado diluyentes comerciales en base a Lecitina de Soya (Biociphos Plus®, AndroMed®, Bioexcell®). Bousseau y col. (1998), reporta que no existió diferencias en la capacidad fertilizante de semen de toro congelado en el diluyente Biociphos Plus®, respecto a un diluyente en base a leche y yema de huevo. Van Wagendonk-de Leeuw y col. (2000), reportan que la utilización del diluyente Biociphos Plus® en semen de toro congelado, generó una disminución significativa en la tasa de No retorno a los 56 días respecto a diluyentes en base a Tris con el agregado de 20% de yema de huevo. No obstante, Aires y col. (2003) obtienen mejores resultados de preñez con la utilización de AndroMed® respecto a diluyentes en base a Tris con la adición de 20% de yema de huevo en semen de toro criopreservado. Gil y col. (2003b), reportaron un comportamiento similar luego de la descongelación de semen de carnero

diluido en Bioexcell® respecto a diluyentes en base a leche y yema de huevo; no encontrando diferencias significativas en la preñez a la ecografía (Gil y col., 2003a).

3.4.2 Glicerol

Es el agente crioprotector usado más extensamente desde su descubrimiento por Polge y col. en el año 1949 (Hafez, 1996). Su acción a nivel de espermatozoides de carnero y toro parece ser diferente, penetrando más fácilmente en los primeros (Nauk y col., 1970, citado por Salamon y Maxwell, 1995a). Su efecto protector es atribuido a su propiedad de unión con el agua, impidiendo la formación de cristales de hielo (Farrant y col., 1977, citado por Salamon y Maxwell, 1995a), no siendo esencial su penetración a la célula para lograr la protección (Salamon y Maxwell, 2000). Actúa como diluyente disminuyendo el grado de disociación de sales. Disminuye la presión osmótica del medio de congelado (Salamon y Maxwell, 1995a).

La aplicación de glicerol ha demostrado disminuir la fertilidad en pollos, pavos y cerdos (Polge, 1951, citado por Pace y Graham, 1974). Colas (1975) (citado por Salamon y Maxwell, 1995a; 2000), sugiere que la concentración óptima de glicerol en semen diluido, va a estar relacionada con la concentración final relativa de espermatozoides. Graham y col. (1978), reportan que niveles superiores a 6 %, han sido perjudiciales para la supervivencia espermática luego de descongelado el material seminal. La inclusión de agentes antioxidantes con efecto crioprotector (Varnavskij y Varnavskaja, 1976; Milovanov y col., 1985), así como incrementos del porcentaje de yema de huevo en el diluyente (Watson y Martín, 1974), reducen los requerimientos de glicerol (citados por Salamon y Maxwell, 2000). Los niveles de glicerol en diluyentes para congelación de semen de carnero están siendo limitados por su toxicidad (Fahy, 1986), debido al daño estructural causado en los espermatozoides durante el pre congelado (Salamon y Maxwell, 2000). No obstante la adición de glicerol al diluyente con yema de huevo, resultó en un significativo aumento en el porcentaje de espermatozoides móviles post descongelación de semen de toro (Pace y Graham, 1974).

3.4.3 Otras sustancias con acción crioprotectora

Sustancias como el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol, el adonitol, polivinil pirrolidona, la albúmina y otros han sido evaluados solos y asociados con glicerol. Ninguno de los agentes examinados probaron ser mejores que el glicerol como agente protector (Salamon y Maxwell 1995a; 2000).

3.5 OTRAS ESTRATEGIAS PARA LA PROTECCIÓN DEL SEMEN ALMACENADO EN FORMA LÍQUIDA

Según Hammerstedt y col. (1990, 1993), bajas tensiones de O₂ mediante saturación de CO₂ modifican procesos oxidativos celulares y el daño de la peroxidación de los lípidos de membrana. Las condiciones aerobias resultan en la inevitable formación de sustancias pro oxidantes. El peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y los grupos oxidrilos, son los principales radicales libres que se producen. El peróxido de hidrógeno (resultante de la diseminación oxidativa de los aminoácidos aromáticos), es el principal y más pernicioso de todos los pro oxidantes formados en la peroxidación de los lípidos de membrana. Los grupos oxidrilos son poderosos iniciadores de la peroxidación de los lípidos (Vishwanath y Shannon, 1997).

Maxwell y Stojanov (1996), reportaron que la utilización de antioxidantes mejora la motilidad y la integridad acrosómica, encontrando que la utilización de la superóxido dismutasa en conjunto con la catalasa, tienen un efecto aditivo sobre la preservación seminal y sobre la recuperación de oocitos fertilizados.

Otras sustancias antioxidantes han sido consideradas como positivas para la preservación, entre ellas la vitamina E, ácido ascórbico, taurina, inositol, BHA (butylato de hydroxinisol), Desferal (mesylato de deferoxamina), piruvato de sodio, glutatión peroxidasa (Maxwell y Stojanov, 1996; Sánchez-Partida y col., 1997; Upreti y col., 1997; 1998). No obstante los resultados in vitro no siempre se correspondieron con los resultados obtenidos in vivo (Sánchez-Partida y col., 1999).

La incorporación del pentobarbital sódico en diluyentes de semen se basa en la inhibición del metabolismo espermático, mediante la disminución del metabolismo mitocondrial. El agregado de pentobarbital sódico no mejoró la fertilidad del semen ovino preservado a 5 °C por 24 horas (Fiser y Langford, 1981). No obstante demostró tener efecto inhibitorio sobre la motilidad espermática a las dos horas de dilución y preservación (Fernández Abella y Villegas, 2000).

3.6 FERTILIDAD DEL SEMEN PRESERVADO LÍQUIDO

La ausencia de información sobre detalles críticos experimentales tales como temperatura de almacenaje, tipo de dilución, volumen y concentración de dosis inseminante, número de hembras servidas y otros, determina que los datos de fertilidad que señala la bibliografía sean muy variados y difíciles de interpretar. No obstante la información sugiere que se produce una disminución de la fertilidad en un rango del 10 al 35 % por cada 24 horas de almacenaje del material seminal (Salamon y Maxwell, 2000).

Independientemente del diluyente, forma de dilución, temperatura y condiciones de almacenamiento, existe un deterioro de la célula espermática a medida que el tiempo de almacenamiento aumenta. Se produce disminución de la motilidad e

integridad de membrana, generando una pérdida de la supervivencia espermática en el tracto femenino, disminución de la fertilidad e incremento de pérdidas embrionarias (Maxwell y Salamon, 1993).

En la Cuadro I se presentan datos sobre resultados de fertilidad luego de la preservación seminal y se adjuntan resultados de algunos diluyentes utilizados en fresco (sin preservación).

Cuadro I. Fertilidad de diferentes diluyentes a temperatura de refrigeración (4 – 5°C)

| Referencia | Diluyente | Horas preservación | Temperatura Almacenamiento | Dilución | Volúmen inseminación (cc) | Nº spz (X10 ⁶) | Ovejas Inseminadas | Fertilidad % |
|--------------------------------|--|--------------------|----------------------------|--|---------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------|
| Habibulin (1965) | Citrato Yema Glucosa | 24 | 0 | 1:2 – 1:3 | 0.1 – 0.5 | 80 | 83 | 72.5 |
| Rabocev (1965) | Citrato Yema Glucosa | Fresco | - | - | 0.05 | N.E | 180 | 79.3 |
| | | 24 | 0 | N.E | N.E | 120 | 8 ^f | 37.5 ^a |
| Colas y col. (1968) | Leche Descremada Catalasa | 2 - 14 | 4 - 15 | 626 x 10 ⁹ por ml | 0.2 | 125 | 136 | 64 |
| Lapwood y col. (1972) | Glucosa | 24 | 5 | 1:10 | 0.1 | 100 | 49 | 26.5 |
| | Fosfato | 24 | 5 | 1:30 | 0.1 | 100 | 48 | 27.1 |
| | NaCl | 24 | 5 | 1:10 | 0.1 | 100 | 49 | 16.3 |
| | Fructosa Yema | 24 | 5 | 1:30 | 0.1 | 100 | 51 | 17.7 |
| Langford y Fiser (1980) | Leche Descremada | 24 | 4 | 9x10 ⁹ por ml ⁻¹ | N.E | N.E | N.E | 74 |
| Fernández Abella y col.(1998) | Leche descr. Citrato Yema Pentobarbital | 24 | 4-5 | 2:1 | N.E | 100 | 30 | 10 ^c |
| | | 24 | 4-5 | 2:1 | N.E | 100 | 34 | 47.1 ^d |
| Fernández Abella y col. (1998) | Leche descr. Tris Lactosa Ácido cítrico Yema ATB | 24 | 4-5 | 2:1 | N.E | 100 | 33 | 30.3 ^c |
| | | 24 | 4-5 | 2:1 | N.E | 100 | 33 | 33.3 ^d |
| Paulenz y col. (2003) | Leche Descremada Yema ATB | 12 | 5 | N.E | 0.25 | 150 | 140 | 61.9 ^e |
| Paulenz y col. (2003) | Tris Yema | 12 | 5 | N.E | 0.25 | 150 | 140 | 51.5 ^e |

^a: porcentaje de oocitos fertilizados/huevos recuperados; ^b doble IA; ^c: IA cervical en primavera; ^d: IA cervical en otoño; ^e ovejas que paren/ovejas inseminadas. N.E: no específica.

Adaptado de Maxwell y Salamon, 1993.

3.7 PRINCIPALES CAUSAS DE DISMINUCIÓN DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN PRESERVADO

La preservación del material seminal afecta algunas características espermáticas tales como la motilidad, actividad respiratoria, integridad de membrana y la calidad del ADN. Consecuentemente la viabilidad es reducida, el transporte en el tracto reproductor es inhibido, el momento de fertilización es alterado y el desarrollo embrionario es afectado (Gillan y col., 2004).

3.7.1 Anatomía Cervical

El cervix constituye la barrera inicial para el avance espermático en el tracto reproductor femenino. En comparación con semen fresco, una menor proporción de células espermáticas almacenadas, depositadas en el orificio externo del cervix durante la inseminación, penetran en el canal cervical y migran hacia el sitio de fertilización (Salamon y Maxwell, 2000). Estos resultados coinciden con los encontrados a nivel nacional (Bonilla Riera, 2000; Fernández Abella y col. 2001), los cuales demostraron mayor velocidad de transporte espermático cuando se realiza la inseminación con semen fresco en comparación con semen diluido y conservado por 24 horas a 4–5 °C, verificado por una población superior de espermatozoides a nivel del tracto genital, principalmente en el cervix a las dos horas post IA.

Diferentes sustancias han sido utilizadas con el fin de mejorar el transporte espermático del semen diluido. Resultados contradictorios se han obtenido por diferentes investigadores. La suplementación con 10 microgramos de prostaglandina F_{2α} por dosis inseminante, generó un incremento de la fertilidad de más del 10% cuando el semen diluido fue de buena calidad (Castrillejo y Rodríguez, 1981). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dimov y Georgiev en 1977, en los cuales la fertilidad aumentó un 15 % (citado por Castrillejo y Rodríguez, 1981). Otros estudios a nivel nacional, no obtuvieron aumento en el transporte espermático al suplementar con prostaglandina F_{2α} semen fresco diluido y semen diluido y conservado por 24 horas, produciéndose una disminución de los niveles espermáticos en cervix y útero con respecto al semen sin suplementar (Bonilla Riera, 2000; Fernández Abella y col., 2001).

Otra sustancia estudiada para lograr una dilatación cervical que permita una deposición más profunda del semen, y de ésta manera mejorar la fertilidad ha sido la oxitocina. Gil y col. (2005), no encuentran diferencia en cuanto a dilatación cervical obtenida mediante el uso de oxitocina por diferentes vías en ovejas en celo, con dosis bajas comparadas con otros estudios.

3.7.2 Alteración de la Motilidad

Según Lopyring (1971) (citado por Salamon y Maxwell, 2000), los espermatozoides afectados funcionalmente por la preservación no migran o migran lentamente. Presentan así una reducción a la mitad de su sobre vida en el tracto femenino, en comparación con espermatozoides sin preservación (Salamon y Maxwell, 2000).

La preservación del material seminal genera una disrupción en los elementos del axonema de la cola, resultando en un número menor de espermatozoides móviles siendo ésta una de las posibles causas de los cambios en el patrón de motilidad (Watson, 1995; citado por Gillan y col., 2004). Los efectos de la preservación sobre la motilidad espermática, explicarían la disminución en la habilidad del espermatozoide para penetrar y atravesar el canal cervical y por ende, el aumento de fertilidad observado cuando el material preservado es depositado directamente en el útero (Maxwell, 1986; citado por Gillan y col., 2004).

3.7.3 Alteración de la Actividad Respiratoria

Según Mann y Lutwak Mann (1981) (citado por Windsor, 1997^a) el espermatozoide de carnero obtiene ATP de diferentes caminos metabólicos, siendo la glicólisis y la respiración mitocondrial los más importantes. El semen de carnero al igual que el de toro podría ser altamente dependiente de la respiración mitocondrial y así proveer el ATP necesario para la motilidad durante el tránsito cervical (Ford y Rees, 1990; citado por Windsor, 1997^a). Según Windsor (1997^a), la inhibición de la glicólisis no afecta la fertilidad, mientras que la inhibición mitocondrial reduce la fertilidad en IA vía cervical, pero no la afecta en IA intrauterina. Concluyendo, la respiración mitocondrial juega un rol importante en la penetración del cervix por parte de los espermatozoides de carnero. Concordando con lo anterior, Gillan y col. (2004) identifican a la injuria mitocondrial como elemento altamente significativo en la disminución de la fertilidad luego de la IA cervical.

Según Gillan y col. (2004), la alteración de la motilidad conjuntamente con la alteración de la actividad respiratoria mitocondrial, podrían explicar la alteración en el transporte espermático. Esto resulta en la muerte prematura de un alto número de espermatozoides preservados en partes posteriores del tracto reproductor de la oveja, luego de la IA cervical o vaginal profunda.

3.7.4 Capacitación Acelerada

Los procesos de enfriamiento y descongelación del semen producen cambios similares a la capacitación fisiológica, los cuales determinan desestabilización de membranas conllevando a la reacción acrosómica (Maxwell y Watson, 1996), y muerte espermática posterior.

La yema de huevo presente en los diluyentes actúa como factor capacitante (Ijaz y col., 1989), y el glicerol genera cambios similares a la capacitación (Slavik, 1987). Gil y col. (2003 b) reportan menor número de espermatozoides no capacitados al usar diluyentes en base a leche con el agregado de 10% de yema de huevo respecto al uso de 5 % de yema. Si la sobrevivencia del espermatozoide es reducida por una capacitación prematura, éste solo tendrá corto tiempo para realizar la fertilización. Éste estado avanzado de membrana del semen preservado, podría explicar la muerte prematura del semen en zonas posteriores del tracto reproductor de la oveja luego de la IA cervical, aumentando además la velocidad de pérdida de semen desde el tracto de la oveja en comparación con el semen fresco (Gillan y col., 1999^b; Gillan y Maxwell, 1999^a; Gillan y col., 2004). Thundatnil y col. (1999), reportan un incremento de la fertilidad de semen de toro descongelado al aumentar el número de espermatozoides viables no capacitados en la dosis inseminante (citado por Gillan y col., 2004).

3.7.5 Alteración en la interacción con las Células Epiteliales del Oviducto

Según Gillan y col. (2000) (citado por Gillan y col., 2004), los espermatozoides preservados se unen y se liberan más rápidamente de las células epiteliales del oviducto respecto a aquellos presentes en el semen fresco. Estas observaciones podrían explicar la limitada sobre vida de los espermatozoides preservados en el tracto reproductivo femenino, y la importancia de la sincronía entre el tiempo de la IA y la ovulación. Lopyring (1971) (citado por Salamon y Maxwell, 2000), reporta una supervivencia espermática de 22–23 horas luego de la IA cervical con semen preservado en forma líquida vs. 27 horas con semen fresco. De Pauw y col. (2002) (citado por Gillan y col., 2004), sugieren que la disminución de la habilidad del semen preservado para interactuar con las células epiteliales del oviducto podría afectar adversamente su fertilidad.

3.7.6 Alteración del Desarrollo Embrionario. Muerte embrionaria

Según Maxwell y Salamon (1993), la muerte embrionaria se define como la muerte del oocito fertilizado o del embrión antes del estado de implantación. Según (Edey, 1976; citado por Maxwell y Salamon, 1993) se considera normal un 20 a 30% de pérdidas embrionarias.

La condición de los gametos al momento de la fertilización afecta el desarrollo y supervivencia embrionaria (Maxwell y Salamon 1993; Vishwanath y Shannon, 1997). Hay evidencias que indican que las pérdidas embrionarias aumentan a medida que la deposición del semen almacenado en el tracto reproductor de la hembra es demorada, resultando en una asincronía entre la edad del espermatozoide y del oocito (Salamon y col., 1979). El mismo autor señala que cuando el semen es almacenado a 5°C, existe una menor supervivencia embrionaria luego de una IA única, comparada con una IA doble. Se confirma así, la importancia del momento de IA para evitar un envejecimiento adicional del espermatozoide.

Los cambios intracelulares durante el almacenamiento del semen generan daños irreversibles a nivel del genoma haploide del núcleo del espermatozoide, resultando en un conceptus no viable (Vishwanath y Shannon, 1997). Un incremento en los porcentajes de yema de huevo utilizados en los diluyentes podría provocar daños del acrosoma por desestabilización de la membrana espermática (Watson y Martín, 1973, 1976; Smith y col., 1978). Esto correlacionaría la calidad del ADN de los espermatozoides de la dosis inseminante con la fertilidad final obtenida (Gillan y col. 2004). Maxwell y Salamon (1993) concluyen que la pobre supervivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino, sumado al incremento en las pérdidas embrionarias luego de la IA con semen preservado, conforman las causas más importantes de baja fertilidad en ovejas inseminadas con semen almacenado líquido.

3.8 TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN SEMINAL

La evaluación “in vitro” de una dosis de semen preservado permite orientar sobre la calidad biológica de esa dosis. La fertilidad evaluada “in vivo” es un método de evaluación costoso, lento y requiere gran número de animales inseminados bajo condiciones similares en un período de tiempo acotado, estando influida por factores intrínsecos y extrínsecos a la dosis de semen, además de factores ambientales y de manejo (Gil y Olivera, 2005). Existen diferentes parámetros seminales que evalúan la calidad biológica de una dosis inseminante, algunas de ellas son:

3.8.1 Motilidad Subjetiva

La evaluación de la motilidad espermática subjetiva (porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva) es una técnica simple, ampliamente utilizada a nivel de laboratorio y campo (Durán del Campo y col., 1993).

Para que un espermatozoide presente motilidad, debe de mantener ciertos parámetros estructurales que le permitan mantener su capacidad potencial fecundante. Sin embargo, el semen de carnero conservaría la motilidad aún luego de sufrir alteraciones que impiden su intervención en la fecundación (Watson, 2000). Las correlaciones reportadas entre la motilidad o características de la motilidad con respecto a la fertilidad son muy variadas. Según Graham y col. (1980) (citado por Rodríguez-Martínez, 1990), la correlación estadística entre la motilidad espermática y la fertilidad del eyaculado varía enormemente entre valores cercanos a cero hasta más de 60%. La velocidad del espermatozoide humano así como la velocidad y porcentaje de motilidad en semen de toro y cerdo, han sido correlacionadas de manera positiva con la fertilidad (Holt y col., 1985; Budworth y col., 1987; Holt y col., 1997; citados por Sánchez-Partida y col., 1999). En contraposición, Eppleston y Maxwell (1995) reportan, que entre varias características seminales estudiadas, solo el número de espermatozoides totales y mótils inseminados por oveja fueron correlacionados con la fertilidad (0.25 y 0.26, respectivamente). Sánchez –Partida y col. (1999) reportan, que existieron correlaciones entre algunas características de la motilidad y la fertilidad, pero que no existió correlación entre la motilidad espermática y la fertilidad.

3.8.2 Integridad de Membrana

La célula espermática está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática (Háñez, 1996). Cuando el semen es enfriado y los espermatozoides sufren el choque térmico ("cold shock") éstos pierden fosfolípidos de la membrana plasmática, se provoca transición de fase en los lípidos, se altera la fluidez y la permeabilidad selectiva (Hammerstedt y col., 1990; Drobniš, y col., 1993), se crea una menor estabilidad a nivel de la membrana espermática (White, 1993), quedando los espermatozoides en un estado avanzado o similar al de la capacitación fisiológica (Garde y col., 1993; Maxwell y Watson, 1996; Watson, 2000).

3.8.3 Estado de Capacitación Espermática Avanzada

Según Gil (2002), se considera a la Capacitación Espermática como los cambios que le permiten al espermatozoide iniciar una reacción acrosómica fisiológica y de esa manera adquirir la capacidad de fecundar un ovocito. Los cambios generados se producen a nivel de los iones intracelulares, en el metabolismo del espermatozoide, en el sistema de AMPc, en el núcleo, en el acrosoma y en la membrana plasmática. Se asume que la capacitación se inicia en el útero o en el istmo, finalizando cuando el espermatozoide se separa de su relación con las células epiteliales en los reservorios para progresar al sitio de la fecundación (Yanagimachi, 1994; citado por Gil, 2002^a).

Watson (1995) (citado por Gillan, 2004), sugiere que los espermatozoides descongelados se encuentran en un estado similar al de la capacitación fisiológica. Gillan y col. (1997), validan la técnica de tinción con Clortetraciclina para la evaluación del estado de membrana de semen de carnero, encontrando que la mayoría de los espermatozoides frescos presentaron a la hora cero de evaluación un patrón de no capacitación, pasando a un patrón de capacitación y finalizando con un patrón de reacción acrosómica durante el transcurso de la incubación. En contraposición, los espermatozoides descongelados exhibían una muy baja proporción de no capacitados desde la hora cero de evaluación, presentando principalmente un patrón de capacitación y luego de reacción acrosómica. De ésta manera demuestra que la criopreservación causaría cambios en las membranas del espermatozoide de carnero similares a la capacitación confirmando la hipótesis sugerida por Watson (1995) (citado por Gillan y col., 2004).

Otros autores citados por Gillan y col. (2004), reportaron que el proceso de enfriamiento y descongelación inducen a cambios similares a la capacitación fisiológica, pudiendo padecer el mismo efecto todas las células espermáticas enfriadas a temperaturas entre 0 y 4 °C. De acuerdo con esto Maxwell y Watson (1996), reportan que los procesos de enfriamiento y descongelación del semen producen cambios similares a la capacitación fisiológica, los cuales determinan desestabilización de membranas conllevando a la reacción acrosómica y muerte espermática posterior. Por lo tanto si la sobre vida del espermatozoide es reducida por una capacitación prematura, éste solo tendrá corto tiempo para realizar la fertilización (Gillan y col., 2004). Incrementos de la fertilidad de semen de toro descongelado han sido reportados

al aumentar el número de espermatozoides viables no capacitados en la dosis inseminante (Thundatnil y col., 1999; citado por Gillan y col., 2004)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en dos fases: la Fase 1, correspondiente a los estudios “*In Vitro*” (o de laboratorio), y la Fase 2, correspondiente a los estudios “*In Vivo*” (o de campo).

4.1 FASE 1: ESTUDIO “IN VITRO”

El estudio se desarrolló en el establecimiento ganadero “Piedra Mora”, propiedad de la Familia Filliol y Barreiro (Ruta 26 Km. 101. El Eucalipto, Paysandú; Latitud Sur 31° 54', Longitud Oeste 57° 14'), y la Regional Noroeste del Laboratorio “Miguel C. Rubino” (Ruta 3 Km. 373; Paysandú, Uruguay), en el mes de marzo del 2004.

4.1.1 Animales

Se utilizaron seis carneros Merino Australiano adultos (6-8D), clínicamente aptos y serológicamente negativos a *Brucella Ovis* (Inmuno-difusión en Gel Agar). Previo a la temporada de servicios, fueron sometidos a un régimen de colecta bi-semanal de semen, por el método de vagina artificial (Duran del Campo y col., 1993). Se establecieron las características necesarias para determinar un semen apto: volumen de 0.75–2 mL, motilidad espermática mayor a 70%, anomalías morfológicas menor a 30%; concentración mayor a 3×10^9 espermatozoides / mL. La alimentación de los carneros durante el período de trabajo fue en base a campo natural mejorado, fardo de alfalfa de buena calidad y 0.5 Kg. de ración balanceada diaria. Por la noche permanecieron estabulados.

4.1.2 Manejo del Semen

Durante el período de estudio “*in vitro*” (seis días o repeticiones, ver Anexos Cuadro N° II), se procedió a la extracción y evaluación seminal, formación del pool de semen, separación en alícuotas y dilución, preservación y evaluación del semen preservado (Esquema N° I). Luego de la colecta, el semen de cada carnero o pool de semen, fue conservado a 30-33 °C hasta su procesamiento.

4.1.2.1 Extracción y evaluación seminal

Se obtuvieron dos eyaculados diarios consecutivos de cada carnero (separados 10 minutos entre cada colecta), por el método anteriormente mencionado. Los eyaculados aprobados, fueron pooleados y manejados como uno solo. Así se minimizó la variación entre eyaculados de un mismo macho (Windsor, 1997^b).

Se realizó observación de volumen, aspecto, color, motilidad subjetiva macroscópica y motilidad subjetiva microscópica, colocando una gota de semen sobre un porta objeto templado sobre platina térmica (Alfa-Laval®). Se evaluó concentración espermática en un fotómetro (Spermacue®, Minitub. Landshut, Germany).

4.1.2.2 Formación del pool de semen

Luego de conocer la concentración y volumen de semen colectado de cada carnero, alícuotas conteniendo igual cantidad de espermatozoides de cada carnero fueron utilizadas para formar un pool de semen entre carneros. De esta forma se procuró minimizar el efecto entre machos (Windsor, 1997^b).

4.1.2.3 Formación de alícuotas y dilución

El pool de semen de carneros se dividió en once alícuotas. Cada alícuota fue diluida paulatinamente hasta la concentración final de inseminación (120×10^6 espermatozoides por dosis) en los once diluyentes en prueba. Para realizar la dilución, se adicionó en primera instancia un volumen de diluyente igual al volumen de semen de la alícuota, para luego agregar lentamente el volumen restante en dos porciones iguales.

4.1.3 Diluyentes

Se procedió a la preparación de once diluyentes en base a leche para la refrigeración de semen. Las bases: Leche UHT, INRA 96® y Fiser, fueron suplementadas con yema de huevo de gallina, glicerol, o la asociación yema de huevo y glicerol. Los once diluyentes fueron:

- 1- **Leche Descremada UHT (UHT)**
- 2- **Leche Descremada UHT + 5% de yema de huevo (UHT 5Y):** leche descremada UHT; 5% (v/v) de yema de huevo de gallina fresco; antibióticos (100.000 UI penicilina G procaínica + 100 mg dihidroestreptomicina en 100 ml de diluyente).
- 3- **Leche Descremada UHT + 2% de Glicerol (UHT 2G):** leche descremada UHT; 2% (v/v) de glicerol; antibióticos.
- 4- **Leche Descremada UHT + 5% de yema de huevo + 2% de Glicerol + antibióticos (UHT 5Y2G).**
- 5- **Diluyente Fiser (Fiser y Langford, 1981) (FISER):** leche descremada en polvo reconstituida al 11% (p/v), inactivada por 10 minutos a 95°C en platina térmica con agitador magnético (Thermoline®, USA); 10.97 gramos Citrato Trisódico; 250.000 UI penicilina G, 310 UI dihidroestreptomicina. Csp 100 ml. pH ajustado a 6.8.

- 6- **Diluyente Fiser + 5% de yema de huevo (FISER 5Y):** igual base que diluyente Fiser, se adicionó 5% (v/v) de yema de huevo.
- 7- **Diluyente Fiser + 20% de yema de huevo (FISER 20Y):** igual base que diluyente Fiser, se adicionó 20% (v/v) de yema de huevo
- 8- **INRA 96® (IMV Technologies; L'AIGLE, France) (INRA).**
- 9- **INRA 96® + 5% de yema de huevo (INRA 5Y):** INRA 96®; 5% (v/v) de yema de huevo.
- 10- **INRA 96® + 2% de Glicerol (INRA 2G):** INRA 96®; 2% (v/v) de glicerol.
- 11- **INRA 96® + 5% de yema + 2% de Glicerol (INRA 5Y2G):** INRA 96®; 5% (v/v) de yema de huevo; 2% (v/v) de glicerol.

Los diluyentes preparados se conservaron congelados en tubos de ensayo troquelados con tapa de rosca. Previo a su utilización se descongelaron a baño maría a 30°C.

4.1.4 Preservación del semen diluido

El semen diluido en cada diluyente se envasó en pajuelas anaeróbicas de 0.25 cc (IMV, Francia; cod. 006937). Las pajuelas fueron selladas anaerobicamente con alcohol polivinílico, identificadas y colocadas por separado según el diluyente, en papel y bolsas individuales. Se procedió a un enfriamiento paulatino hasta 5°C durante su traslado al laboratorio, en un tiempo aproximado de 1.5 a 2 horas (Evans y Maxwell, 1987).

4.1.5 Evaluación del semen preservado

Este proceso fue realizado en el laboratorio. De un pool de 3 pajuelas por diluyente, se evaluaron los siguientes parámetros seminales: motilidad espermática subjetiva a 38°C, integridad de membrana espermática, y estado de capacitación espermática. Para cada diluyente estos parámetros fueron observados en cinco momentos de preservación a 5°C: 0, 12, 24, 48 y 72 horas post enfriado del semen.

4.1.6 Pruebas de laboratorio

4.1.6.1 Motilidad espermática subjetiva

Se procedió a evaluar una muestra de semen a 38°C mediante el uso de cámara (Makler-Haifa®, Israel). Se templó la cámara, se colocaron 10 µl del semen refrigerado, se colocó el cubreobjetos de la cámara y se observó mediante microscopio óptico. Se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea uniforme asignando un valor promedio de 4 campos ópticos (escala ordinal de 5 en 5, de 0 a 100).

4.1.6.2 Integridad de membrana espermática (Fluorescencia doble, Garner y Johnson, 1995) (Ver Anexos).

Esta técnica se basa en la tinción del ADN de los espermatozoides (Fertilight®, Sperm Viability. Kit L-7011, Molecular Probes, SYBR-14/Yoduro de Propidio). El SYBR-14 es un colorante permeable a las membranas, fluoresce cuando se excita con luz ultravioleta en un rango de 300 nm y emite un color verde brillante en el núcleo de los espermatozoides vivos. El Yoduro de Propidio solo ingresa a células con membranas plasmáticas dañadas, fluoresce cuando se excita con luz UV en un rango de 535 nm y emite un color rojo brillante en los espermatozoides que perdieron su integridad de membrana. La observación se realizó bajo microscopio de luz UV (Hertel & Reuss®, Optik 35 –Kassel- West Germany).

En el campo óptico se pueden observar tres poblaciones de espermatozoides: los teñidos por el SYBR-14 (vivos), los teñidos por el Yoduro de Propidio (con pérdida de integridad de membrana), y los espermatozoides que presentan doble tinción (moribundos, comenzando esa transición desde la región posterior de la cabeza del espermatozoide avanzando hacia la porción anterior). Se clasificaron 200 células y se expresó en porcentaje cada población.

4.1.6.3 Estado de Capacitación espermática (Fluorescencia doble, Gil y col., 2000) (Ver Anexos)

Esta técnica se basa en la formación de complejos de Clortetraciclina-iones de Calcio los cuales se ligan principalmente a regiones hidrofóbicas como la membrana celular, resultando en patrones de tinción característicos exhibidos por la membrana espermática. La Clortetraciclina (CTC), es un antibiótico fluorescente que atraviesa la membrana celular del espermatozoide e ingresa a los compartimientos celulares que contienen Calcio libre. Al ingresar a los compartimientos la CTC eléctricamente negativa, es atraída por la carga positiva del Calcio, se forman los complejos CTC– Calcio y se torna más fluorescente (Tsien, 1989; citado por Gillan y col., 1997).

La capacitación fisiológica genera reorganización de componentes de la membrana plasmática y flujo de calcio hacia los espacios intracelulares. Éstos flujos de calcio también ocurren a medida que se produce una disminución de la temperatura de

la dilución, y cuando la célula espermática es sometida a stress por frío (“cold shock”) (Robertson y Watson, 1986). El Yoduro de Propidio es utilizado para eliminar las células muertas y así clasificar en que patrón de capacitación están solo las células vivas. Los espermatozoides contabilizados se clasificaron en tres estadios de capacitación: no capacitados o CTC–F (la cabeza del espermatozoide se observaba uniformemente fluorescente), capacitados o CTC–B (los espermatozoides presentaban una banda libre de fluorescencia en la región post acrosómica) y espermatozoides con reacción acrosómica o CTC–AR (la cabeza del espermatozoide se presenta no fluorescente o con una fina banda fluorescente en el segmento ecuatorial). Se clasificaron al menos 100 células, asignándolas a uno de los patrones mencionados y se expresó en porcentaje.

4.1.7 Diseño experimental

Diseño de muestras divididas, factorial de 3 X 4.

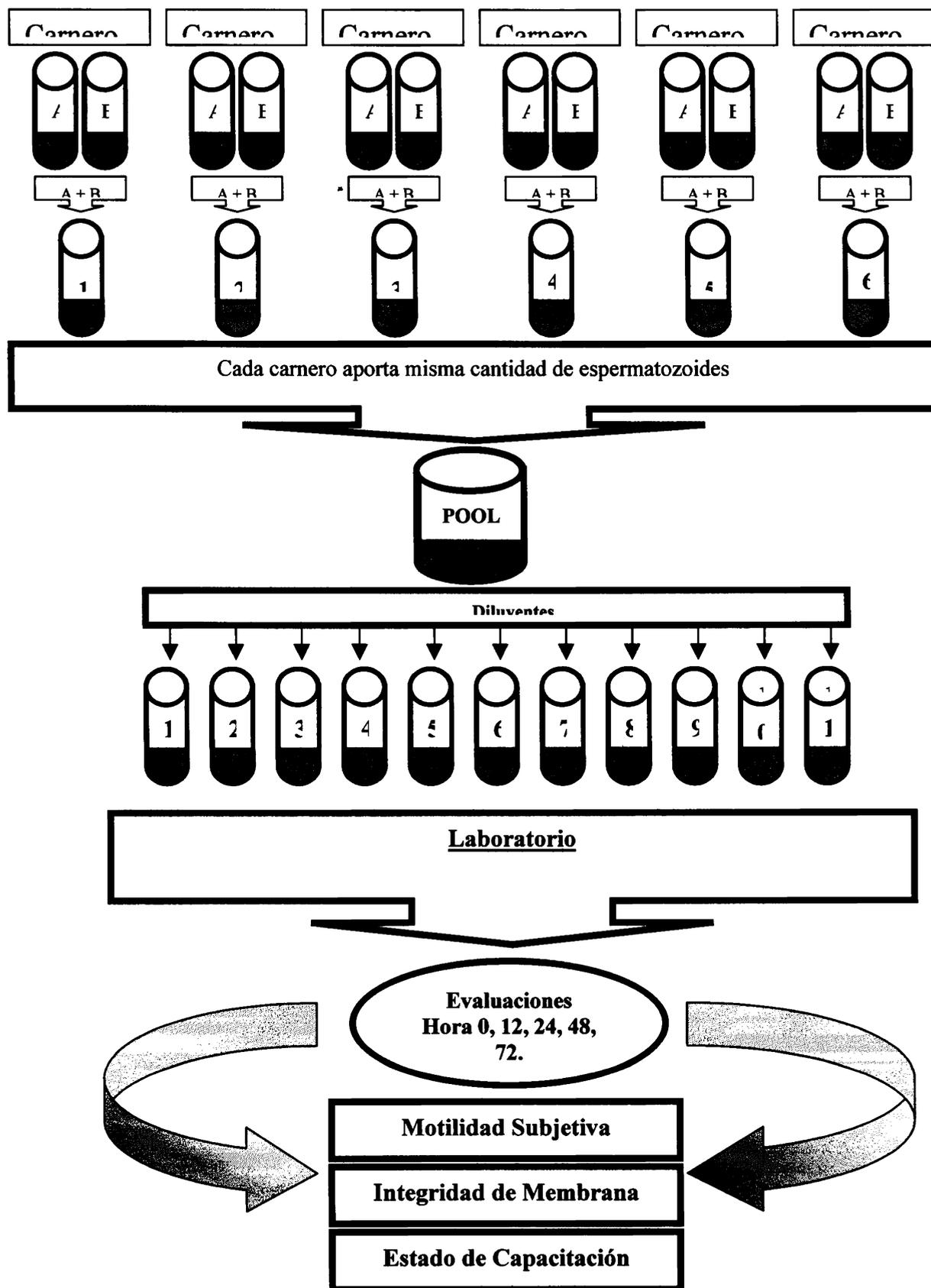
Semen pool (seis carneros) x once diluyentes x cinco momentos de preservación (0, 12, 24, 48 y 72 h a 5°C) x seis replicados (días).

Las variables cuantificadas en cada momento de preservación fueron: Motilidad espermática (% de espermatozoides motiles), Integridad de Membrana (% de espermatozoides con membrana intacta) y No Capacitación Espermática (millones de espermatozoides no capacitados reales; calculado en base al % de espermatozoides con integridad de membrana).

4.1.8 Análisis estadístico

Las variables Motilidad espermática y No capacitación espermática fueron analizadas según modelos lineales generalizados simples (ANOVA; SAS Institute Inc., 2000). La variable Integridad de membrana fue analizada según un modelo lineal generalizado asumiendo distribución binomial (SAS Institute Inc., 2000). Se considero el efecto del diluyente, del momento de preservación y la interacción entre ellos.

Figura N° I: Diseño Experimental Fase 1 "In vitro"



4.2 FASE 2: ESTUDIOS “IN VIVO”

Se llevó a cabo en el mismo establecimiento ganadero que los estudios “in vitro”, durante el mes de abril del 2004.

4.2.1 Animales

Se utilizaron los mismos seis carneros que en la Fase 1 y un total de novecientas ovejas Merino Australiano.

4.2.2 Extracción, formación del pool y dilución seminal

Se realizó la misma metodología descrita para cada paso en la Fase 1.

4.2.3 Diluyentes

Fueron contrastados, los diluyentes que presentaron mejor comportamiento en los parámetros seminales evaluados en la Fase 1, uno de los que presentó inferior comportamiento y un diluyente Control (semen no refrigerado diluido en Leche Descremada UHT estándar, para igualar el volumen y dosis de la IA). Los diluyentes utilizados en ésta fase fueron:

- 1- **Leche Descremada UHT (Control no refrigerado) (UHT)**
- 2- **Leche Descremada UHT + 5% de yema de huevo (UHT 5Y)**
- 3- **Leche Descremada UHT + 5% de yema de huevo + 2% de Glicerol (UHT 5Y2G)**
- 4- **INRA 96® + 5% de yema de huevo (INRA 5Y)**
- 5- **INRA 96® + 5% de yema de huevo + 2% de Glicerol (INRA 5Y2G)**
- 6- **Fiser + 20% de yema de huevo (FISER 20Y)**

El pool de semen generado cada día fue asignado en forma equitativa al grupo Control (con IA en el momento) y los restantes diluyentes preservados a 5°C por 24 h (con IA al día siguiente).

4.2.4 Preservación del semen diluido y manejo pre inseminación

Se realizó envasado anaeróbico de cada diluyente. Para ello se utilizaron jeringas descartables de 10 cc con émbolo de plástico, selladas con alcohol polivinílico. Se procedió al enfriamiento paulatino hasta 5°C en un período de 1.5 a 2 horas. Se preservaron, en caja térmica con refrigerantes a 5°C durante 24 horas hasta su utilización. La temperatura se controló con un termómetro con termo cupla.

El semen previo a la inseminación fue manejado a temperatura ambiente, protegido de la luz solar y de cambios de temperatura bruscos por corrientes de aire. Se procedió a la evaluación microscópica de la motilidad subjetiva.

4.2.5 Manejo de la inseminación artificial (IA)

Ovejas: Se utilizaron ovejas multíparas de raza Merino Australiano en celo natural. Fueron manejadas sobre campo natural reservado a estos fines, presentando un estado corporal medio de 3.45 ± 0.45 (rango: 2.75 - 4.25) (Russel y col., 1969).

Detección de ovejas en estro: La detección de celo se realizó una vez al día mediante el empleo de capones de la misma raza, androgenizados con testosterona (Ciclopentilpropionate 200 mg/dosis, 3 dosis separadas 7 días; Testosterona Ultra Fuerte®, Laboratorio Dispert Uruguay) y utilizados al 2%.

Método y momento de IA: Se inseminó cada día vía cervical con pistola y vaginoscopio Walmur®, igual número de ovejas por cada uno de los seis protocolos (ver Anexos Cuadro N° III). La dosis inseminante fue en todos los casos de 120×10^6 de espermatozoides, contenidos en un volumen de inseminación de 0.2 cc, como forma de mantener la relación semen-diluyente utilizada en la Fase 1.

Con el propósito de minimizar el efecto “día de IA” y de completar un número importante de servicios en cada protocolo (n= 150), la IA se extendió por once días, totalizando 900 ovejas inseminadas.

4.2.6 Diseño experimental

Diseño de muestras divididas.

Semen pool (seis carneros) x seis diluyentes x once días.

La variable de respuesta fue la fertilidad (ovejas gestantes/ovejas inseminadas) evaluada a los 30 días de la última IA por medio de ecografía transrectal (Aloka® 500, 5.0 Mhz; Japón).

4.2.7 Análisis estadístico

Los resultados de fertilidad de los diferentes diluyentes fueron comparados por el test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher (Sigel, 1956).



4.3.1 Relación “IN VITRO-IN VIVO”

- Se plantea definir la relación observada entre los parámetros seminales evaluados
- “in vitro” (24 horas de preservación), y la fertilidad obtenida “in vivo” para los diluyentes comparados.

4.3.1.1 Análisis estadístico

Se determino el coeficiente de Correlación (R) entre estas variables (Pearson Correlation Coefficient; SAS Institute, 2000).

5. RESULTADOS

FASE 1- ESTUDIOS "IN VITRO"

Motilidad espermática

Los resultados para esta variable se presentan en la Figura II y en el Cuadro IV. Se observa que existió un efecto del diluyente y del momento de preservación dentro del diluyente, sobre la Motilidad espermática ($P < 0.05$). No se observó interacción entre estos efectos ($P > 0.05$).

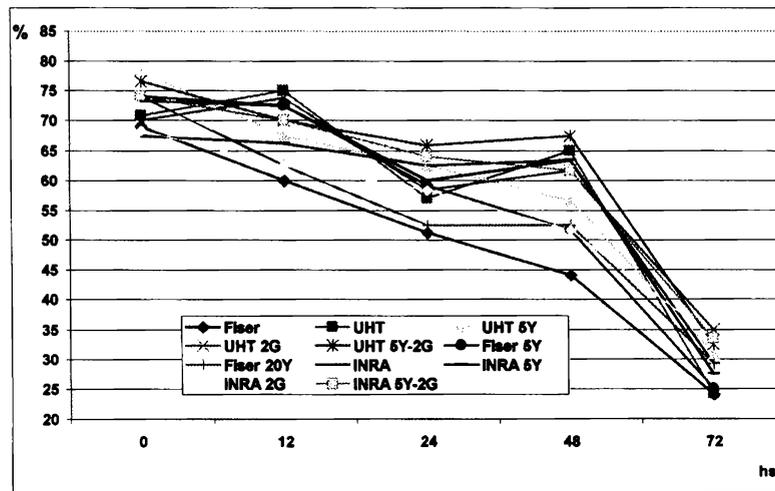


Figura N° II. Evolución de la Motilidad espermática de 11 diluyentes de semen de camero en cinco momentos de preservación a 5°C (medias en % de motiles)

Se observo, que independientemente del diluyente, la Motilidad espermática disminuyo a medida que el momento de preservación se incrementa, produciéndose una brusca caída luego de las 48 hs.

Cuadro IV. Efecto de 11 diluyentes de semen de camero a 5°C sobre la Motilidad espermática evaluada hasta las 72h (% , media de mínimos cuadrados \pm ee)

| Diluyente | Motilidad espermática (%) * |
|---------------|------------------------------|
| FISER | 49.0 \pm 2.5 ^b |
| UHT | 57.2 \pm 2.3 ^{ab} |
| UHT 5Y | 58.6 \pm 2.3 ^a |
| UHT 2G | 58.7 \pm 2.3 ^a |
| UHT 5Y2G | 61.9 \pm 2.3 ^a |
| FISER 5Y | 55.3 \pm 2.3 ^{ab} |
| FISER 20Y | 53.6 \pm 2.3 ^b |
| INRA 96® | 57.1 \pm 2.3 ^{ab} |
| INRA 96® 5Y | 58.4 \pm 2.3 ^a |
| INRA 96® 2G | 54.3 \pm 2.3 ^b |
| INRA 96® 5Y2G | 59.9 \pm 2.4 ^a |

*: letras diferentes, P<0.05

En el período observación (hasta las 72 horas), los diluyentes UHT 5Y 2G, UHT 5Y, UHT 2G, INRA 96® 5Y 2G e INRA 96® 5Y tuvieron un mejor porcentaje de espermatozoides con Motilidad que los diluyentes FISER, FISER 20Y e INRA 96® 2G (P<0.05) (Tabla IV).

Integridad de Membrana

En la Figura N° III y en los Cuadros V y VI se presentan los resultados para esta variable. Se observa que existió un efecto del diluyente y del momento de preservación dentro del diluyente sobre la Integridad de Membrana (P<0.05). No se observó interacción entre éstos efectos (P>0.05).

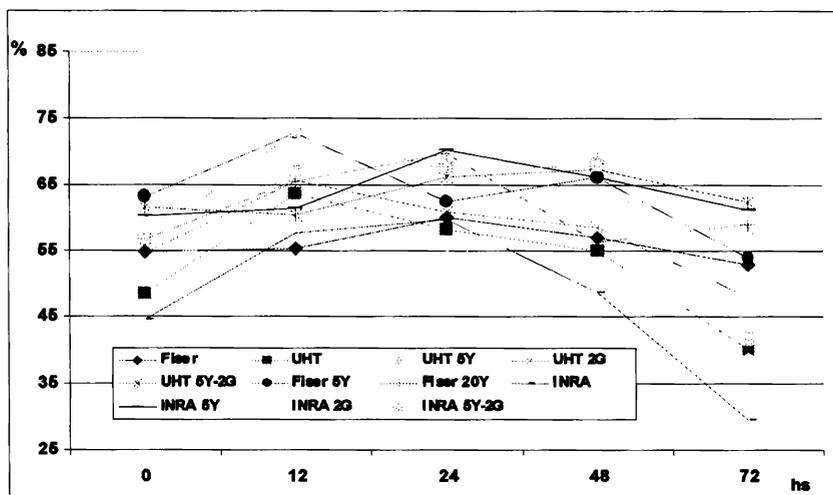


Figura N° III. Evolución de la Integridad de Membrana de 11 diluyentes de semen de camero en cinco momentos de preservación a 5°C (medias en %)

Cuadro N° V. Efecto de 11 diluyentes de semen de camero a 5°C sobre la Integridad de Membrana espermática (% , medias ajustadas).

| Diluyente | Integridad de Membrana (%)* |
|---------------|-----------------------------|
| UHT 5Y | 66.3 ^a |
| INRA 5Y | 63.7 ^{ab} |
| FISER 5Y | 63.7 ^{ab} |
| UHT 5Y2G | 63.4 ^{ab} |
| INRA 96® 5Y2G | 61.5 ^{ab} |
| FISER 20Y | 60.9 ^{abc} |
| UHT 2G | 57.8 ^{bcd} |
| FISER | 54.3 ^{cde} |
| UHT | 52.8 ^{de} |
| INRA 96® 2G | 49.9 ^e |
| INRA 96® | 47.4 ^e |

*: letras diferentes, P<0.05

Los diluyentes UHT, INRA 96® y FISER con el agregado de yema de huevo, con o sin glicerol, no presentaron diferencias significativas entre ellos en el porcentaje de espermatozoides con Integridad de Membrana (P>0.05). No obstante fueron superiores a sus respectivas bases (P<0.05), excepto el diluyente FISER 20Y. Los diluyentes base UHT, INRA 96® y FISER, no difirieron entre ellos en el porcentaje de espermatozoides con Integridad de Membrana (P>0.05).

Los diluyentes que poseen solo el agregado de 2% de glicerol no se diferenciaron en forma significativa de sus bases ($P>0.05$).

Cuadro N° VI. Efecto del momento de preservación sobre la Integridad de Membrana espermática (% , medias ajustadas).

| Momento de preservación (h) | Integridad de Membrana (%)* |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 0 | 56.4 ^b |
| 12 | 61.4 ^a |
| 24 | 63.5 ^a |
| 48 | 61.3 ^a |
| 72 | 49.4 ^c |

*: letras diferentes, $P<0.05$

Se observó que en forma independiente del diluyente, el porcentaje de células espermáticas con Integridad de Membrana permaneció constante desde la hora 12 a las 48, disminuyendo en forma significativa a la hora 72 de preservación respecto a las demás horas de observación ($P<0.05$).

Estado de Capacitación espermática

En la Figura N° IV y en los Cuadros VII y VIII se presentan los resultados para el estadio No Capacitado. Se observa que existió un efecto del diluyente y del momento de preservación dentro del diluyente sobre la No Capacitación espermática ($P<0.05$). No se observó interacción entre estos efectos ($P>0.05$).

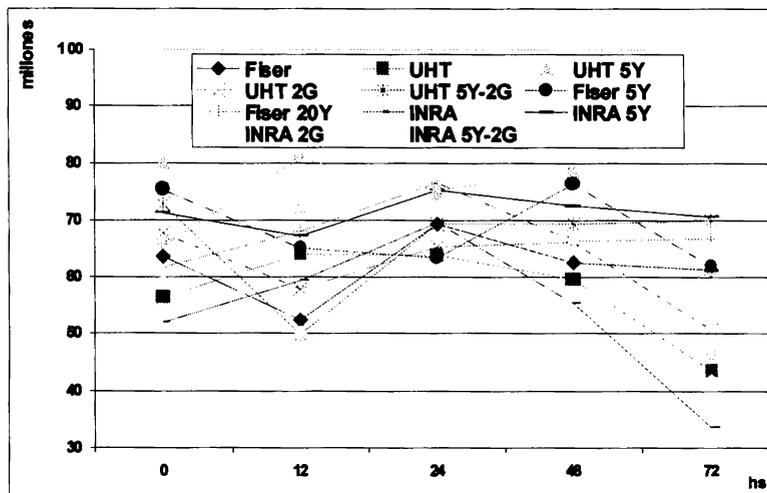


Figura N° IV. Evolución de la No Capacitación espermática de 11 diluyentes de semen de camero en cinco momentos de preservación a 5°C (millones de espermatozoides)

Cuadro N° VII. Efecto de 11 diluyentes de semen de camero a 5°C sobre la No Capacitación espermática (millones de espermatozoides, media de mínimos cuadrados).

| Diluyente | No Capacitación (millones de espermatozoides)* |
|---------------|--|
| UHT 5Y | 72.9 ±2.8 ^a |
| INRA 96® 5Y | 70.9 ±2.8 ^a |
| INRA 96® 5Y2G | 68.8 ±2.8 ^{ab} |
| FISER 5Y | 67.9 ±2.8 ^{ab} |
| FISER 20Y | 67.6 ±2.9 ^{ab} |
| UHT 5Y2G | 65.9 ±2.9 ^{abc} |
| UHT 2G | 61.1 ±2.8 ^{abc} |
| FISER | 59.1 ±3.1 ^{abc} |
| UHT | 57.1 ±2.8 ^{bc} |
| INRA 96® 2G | 55.8 ±2.8 ^{bc} |
| INRA 96® | 53.7 ±2.8 ^c |

*: letras diferentes, P<0.05

Los diluyentes UHT e INRA 96® con el agregado de 5% de yema de huevo, con o sin glicerol, no se diferenciaron significativamente entre sí en el número de espermatozoides No Capacitados (P>0.05). Sin embargo, fueron superiores a sus respectivas bases (P<0.05), a excepción del diluyente UHT 5Y2G. Los diluyentes base

UHT, INRA 96® y FISER no difirieron entre ellos en el número de espermatozoides No Capacitados ($P>0.05$).

Los diluyentes con el agregado de solo glicerol (UHT 2G, INRA 96® 2G), no presentaron diferencias en el número de espermatozoides No Capacitados entre si ($P>0.05$), ni con respecto a sus bases.

El diluyente base FISER tuvo un comportamiento similar con el agregado de 5 o 20% de yema ($P>0.05$).

Cuadro N° VIII. Efecto del momento de preservación sobre la No Capacitación espermática (millones de espermatozoides, media de mínimos cuadrados)

| Momento de Preservación (h) | No Capacitación (millones de espermatozoides)* |
|-----------------------------|--|
| 0 | 65.9 \pm 2.0 ^{ab} |
| 12 | 60.3 \pm 2.2 ^{bc} |
| 24 | 69.0 \pm 2.0 ^a |
| 48 | 68.3 \pm 2.0 ^{ab} |
| 72 | 55.1 \pm 2.0 ^c |

*: letras diferentes, $P<0.05$

Se observó que en forma independiente del diluyente, el porcentaje de espermatozoides No Capacitados permaneció en términos generales constante hasta la hora 48, disminuyendo en forma significativa a la hora 72 de preservación ($P<0.05$).



FASE 2 ESTUDIOS “IN VIVO”

Los resultados obtenidos en el ensayo *In Vivo* se presentan en la Figura N° V. Se observa, que la fertilidad del diluyente Control fue significativamente superior a la de todos los diluyentes con semen preservado a 5°C por 24 h utilizados ($P < 0.05$). La fertilidad media de los diluyentes con preservación a 5°C fue de 53.6%.

Los diluyentes UHT 5Y2G, INRA 96® 5Y e INRA 96® 5Y2G presentaron una fertilidad significativamente mayor que el protocolo FISER 20Y ($P < 0.05$). El diluyente UHT 5Y tuvo un comportamiento intermedio entre estos diluyentes de preservación ($P > 0.05$).

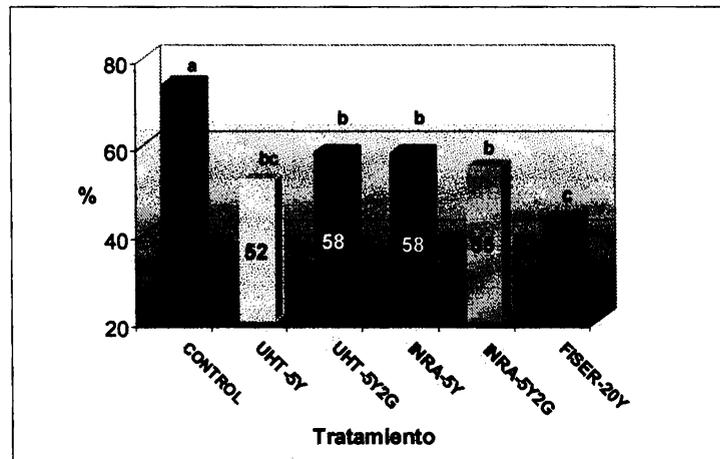


Figura N° V. Fertilidad según diluyente de preservación de semen de camero a 5°C a los 30 días post IA (%): letras diferentes, $P < 0.05$

RELACION “IN VITRO-IN VIVO”

La correlación observada entre los parámetros seminales determinados in vitro a las 24 h y la fertilidad observada a campo para los diluyentes comparados fue de +0.07, -0.28 y -0.22 (Motilidad espermática, Integridad de membrana y No Capacitación espermática, respectivamente) ($P > 0.05$).

La correlación observada entre los parámetros Integridad de membrana y estado de No Capacitación espermática fue de +0.86 ($P < 0.01$).

6. DISCUSIÓN GENERAL

La metodología aplicada en éste trabajo para estudiar el efecto de diversos diluyentes de preservación a 5°C sobre la calidad seminal y la fertilidad del semen de carnero, procura que dicha evaluación no se vea interferida por efectos aditivos a los mismos. Pese a que la fertilidad es el parámetro más importante de evaluación de los diluyentes de preservación seminal, resulta ser un parámetro de difícil manejo ya que sobre ella influyen muchos factores ajenos a la preservación propiamente dicha. Así, el estudiar previamente *in vitro* lo que luego será implementado a campo, permitió analizar el comportamiento de un número más importante de diluyentes, administrando mejor los recursos disponibles.

El uso de un pool de semen de diferentes carneros permitió, en este estudio, estandarizar el efecto de la variación individual entre machos. El uso de dos eyaculados de cada carnero para cada replicado permitió minimizar la variación entre eyaculados de un mismo macho. Esta metodología permitió además, manipular con mayor seguridad las alícuotas para estudiar los diferentes diluyentes de conservación (Windsor, 1997^b).

En lo referente a los parámetros seminales evaluados, la Motilidad espermática progresiva se observa en aquellos espermatozoides que presentan una serie de atributos estructurales y fisiológicos altamente relacionados con la fertilidad. Otros parámetros de viabilidad espermática, como la Integridad de Membrana y el estado de Capacitación, también se relacionan con la fertilidad, pero son más complejos y costosos de realizar, por lo que generalmente escapan de las evaluaciones de rutina. En nuestro estudio, se incluyeron también resultados de los últimos dos parámetros mencionados como forma de profundizar más en el grado de estrés al que se someten los espermatozoides (Maxwell y Watson, 1996).

La estrategia de analizar el efecto de los diluyentes más allá del tiempo considerado para los estudios *in-vivo* (24 horas), fue realizada ante la posibilidad de que se manifiesten con el transcurso de las horas, más ampliamente las diferencias entre ellos.

A medida que el tiempo de preservación aumentó, los espermatozoides perdieron Motilidad, confirmándose de ésta manera la pérdida de calidad espermática reportada por algunos autores (Maxwell y Salamon, 1993; Fernández Abella y col., 1998; Gillan y col., 2004). No obstante, se identificaron diluyentes que conservaron a las 72 horas mayores porcentajes de espermatozoides móviles. Los diluyentes UHT 5Y, UHT 2G, UHT 5Y2G, INRA 96@ 5Y e INRA 96@ 5Y2G no presentaron diferencias significativas de Motilidad espermática subjetiva entre ellos, teniendo si, un comportamiento superior durante todo el período de observación que los protocolos FISER, FISER 20Y y el INRA 2G. Estos resultados indicarían en primera instancia, que la adición de glicerol a diluyentes que poseían yema de huevo, no mejoraría la motilidad espermática. Los resultados obtenidos en éste parámetro seminal difieren de lo señalado por Pace y Graham (1974), donde el agregado de glicerol a diluyentes con yema de huevo para la criopreservación seminal, resultó en un significativo aumento de

espermatozoides móviles post descongelado. No obstante, cabe destacar que los autores trabajaron sobre semen descongelado de toro, lo cual podría indicar que los espermatozoides refrigerados no serían beneficiados en la misma proporción que aquellos que sufrieron los daños de la criopreservación y descongelación. Pese a que lo ideal sería prescindir de la yema de huevo, aun hoy es difícil encontrar con facilidad un aditivo que la remplace.

Los diluyentes base con el agregado de 5% de yema de huevo presentaron una proporción mayor de espermatozoides con Integridad de Membrana que los diluyentes base. Estos resultados podrían indicar que el agregado de yema de huevo generó una mayor protección de las membranas espermáticas, coincidiendo con lo reportado por Pace y Graham (1974), quienes señalan que ningún diluyente es capaz de proteger la célula espermática ante el enfriamiento en ausencia de yema de huevo. Por otra parte, el solo agregado de glicerol a las bases no generó una mejor protección de las membranas espermáticas.

La asociación de los aditivos yema y glicerol, no generó efectos beneficiosos en la proporción de espermatozoides con Integridad de Membrana respecto a la utilización de yema de huevo como único aditivo a las bases. Estos resultados podrían estar reflejando la toxicidad del glicerol tal como ha sido reportado por algunos autores (Polge, 1951, citado por Pace y Graham, 1974; Fahy, 1986).

El agregado de un alto porcentaje de yema de huevo al diluyente Fiser (20%), no generó una mejor proporción de espermatozoides con Integridad de Membrana, respecto al agregado de solo 5% de yema. No obstante, generó una protección intermedia respecto a su base (sin yema). Esto concuerda con lo citado por Gil y col. (2003 b), quienes reportaron que el uso de más de 10% de yema de huevo conlleva a un inferior comportamiento de los diluyentes en los parámetros seminales evaluados (Motilidad espermática, Integridad de membrana, estado de Capacitación espermática). El agregado de altos porcentajes de yema de huevo no serían beneficiosos para la preservación seminal debiendo ser evitados tal como cita Smith y col. (1978).

Se observó un aumento de la proporción de espermatozoides con Integridad de membrana a la hora 12, 24 y 48 respecto a la hora 0. Esto podría deberse, a que los conteos de la técnica se implementan sobre un número limitado de espermatozoides (200 totales), las cuales serían posiblemente, una muestra poco representativa de los millones de espermatozoides que constituyen la muestra refrigerada. Esta limitante podría levantarse mediante el uso de equipos más sofisticados como la citometría de flujo, que permitan incluir cantidades mayores de células evaluadas (Garner y col., 1986).

La relación observada en el parámetro Integridad de Membrana, a favor de los diluyentes UHT e INRA 96® con el agregado de 5% de yema de huevo, se mantuvo en el parámetro de No Capacitación espermática para estos diluyentes. De la misma forma, la adición de 20% de yema de huevo al diluyente con base FISER mantuvo el comportamiento observado en el parámetro Integridad de Membrana, no mejorando el número de espermatozoides No Capacitados respecto al uso de 5% de yema. Esto

podría indicar, que diluyentes que proveen mejor protección a las membranas de los espermatozoides, conllevarían a obtener una dosis con un mayor número de espermatozoides no Capacitados, lo que redundaría en una vida media mayor de la misma (Guillan y col., 1999), y un posible aumento en la fertilidad (Thundatnil y col., 1999; citado por Gillan y col., 2004). La alta correlación obtenida entre éstas variables en nuestro ensayo coincide con ésta observación.

Los diluyentes de preservación refrigerada en estudio presentaron en términos generales, un comportamiento en los parámetros de Integridad de membrana y No Capacitación espermática similar hasta la hora 48 de preservación. Se observó una disminución significativa de ambos parámetros hacia la hora 72. Esto podría indicar que las alteraciones a nivel de la membrana plasmática observadas, no serían originadas por la preservación seminal mantenida a 5°C (al menos hasta las 48 horas), sino que simplemente se producirían tempranamente durante el proceso de enfriamiento y llegada a 5°C. En base a éstos resultados se puede inferir que, la disminución progresiva de la temperatura (Evans y Maxwell, 1987), y la adición de fosfolípidos al diluyente (Salamon y Maxwell, 1993), generan cierto grado de protección, sufriendo los espermatozoides aunque en menor medida los efectos detrimentales del cold shock sobre la integridad de las membranas. No obstante esto, se identificaron diluyentes que en las diferentes horas de observación preservaron las células espermáticas de manera significativamente superior a los demás.

La preservación seminal por 24 horas a temperatura de 5°C provocó una disminución de la fertilidad promedio del 20%, respecto al lote Control, con un rango de variación del 16 al 31% dependiendo del diluyente. Estos resultados coinciden, con el rango de 10 a 35% de disminución de fertilidad, por cada 24 horas de almacenaje, reportado por Salamon y Maxwell (2000). La fertilidad obtenida con los diluyentes en base a leche UHT fue similar a la reportada por autores extranjeros trabajando con diluyentes en base a leche descremada en polvo y 5% de yema de huevo, con preservación a 5 °C por 12 horas (61.9%; Paulenz y col., 2003).

Dado que la asociación de yema de huevo y glicerol, no generó una mayor fertilidad respecto al uso de la yema de huevo como único aditivo, parecería adecuada la no inclusión del glicerol en el diluyente. No obstante, en los diluyentes en base a UHT se observó una tendencia a un aumento en la fertilidad del 6 %, no significativo, al asociar el glicerol respecto a no hacerlo. Esto podría ser explicado, por el hecho de que el glicerol aportaría cierto grado de seguridad ante variaciones de la temperatura en el refrigerado, lo cual llevaría a que los diluyentes sin glicerol quedaran mas desprotegidos ante eventuales fluctuaciones, típicas de condiciones de campo. Para estudiar ésta hipótesis habría que registrar fluctuaciones de temperatura (máxima y mínima), a las cuales pudieron estar sometidas las dosis de IA durante la refrigeración, o someter las dosis a diferentes niveles de frío y así observar el efecto que produce sobre la calidad seminal.

Por otra parte, el diluyente base INRA 96® tuvo un comportamiento inverso a favor de la adición solo de yema (3%, no significativo), respecto a la asociación de yema y glicerol. Este último caso, en el cual se evalúa un diluyente comercial del cual

no se conocen sus componentes, podría indicar la presencia de algún crioprotector que se potencia con el glicerol que se le adicionó, y así generar cierto grado de toxicidad a la célula espermática.

El diluyente FISER-20Y, que tuvo un comportamiento menor a los demás protocolos, generó resultados de fertilidad similares a los obtenidos anteriormente a nivel nacional (35 a 50%, Fernández Abella y col., 1998). Cabe destacar, que la comparación entre ambos resultados es dificultosa ya que en el trabajo citado se utilizó un bajo número de animales, IA cervical a tiempo fijo en ovejas sincronizadas con esponjas de MAP, y acondicionamiento seminal no anaeróbico.

Los parámetros seminales evaluados en este estudio aportaron información crucial sobre la calidad biológica de una dosis de semen. Aquellos diluyentes con un mejor comportamiento en las evaluaciones de laboratorio fueron los que presentaron luego una mayor fertilidad a campo. No obstante, los coeficientes de correlación observados entre parámetros individuales y la fertilidad no fueron altos, posiblemente porque las diferencias entre los diluyentes no fue lo suficientemente grande para proyectar correlaciones significativas. Esto confirmaría lo reportado por Amann (1989), acerca de que aunque no se conoce el grado de importancia que cada uno de los diferentes parámetros espermáticos tiene, sí se sabe que la evaluación de más de uno fortalece el criterio de selección de tratamientos más favorables para la preservación. Sin embargo Paulenz y col. (2002), obtuvieron mediante la evaluación *in vitro* de diluyentes para la preservación de semen refrigerado, resultados que no se vieron reflejados *in vivo* (Paulenz y col., 2003). Esto confirma lo citado por Sánchez Partida y col., (1999), quienes reportan que no necesariamente los resultados de las pruebas de laboratorio son siempre reflejadas a campo. El estudio de la fertilidad medida directamente sobre una majada, constituye un resultado con variables aditivas no solo inherentes al proceso de refrigeración y preservación.

De acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* en los parámetros Integridad de Membrana y estado de No Capacitación espermática, se podría esperar para los diluyentes seleccionados, resultados de fertilidad con un solo servicio similares a los obtenidos aquí luego de 24 horas de refrigeración, tras períodos mayores a 5°C (hasta 48 horas). Serían depositados en el tracto genital femenino poblaciones espermáticas que desde el punto de vista de su estado de membrana y número de espermatozoides no capacitados serían similares. Con éstos períodos de preservación, la Motilidad espermática subjetiva sería un parámetro seminal del cual partir para determinar el uso o no de ese material refrigerado.

7. CONCLUSIONES

- 1) La Motilidad espermática, la Integridad de Membrana y el estado de Capacitación espermática son tres pruebas de laboratorio que asociadas podrían generar adecuada información a la hora de seleccionar diluyentes de preservación.
- 2) La adición de 5% de yema de huevo en los diluyentes en base a leche UHT e INRA 96®, generó una mejora en la calidad biológica del semen para la preservación a 5°C.
- 3) La preservación de semen de carnero por 24 horas a 5°C, independientemente del diluyente usado, generó una disminución de la fertilidad con respecto al semen fresco.
- 4) Se identifican diluyentes (UHT 5Y2G, INRA 96® 5Y e INRA 96® 5Y2G) que presentaron buenos resultados de fertilidad con un solo servicio.
- 5) La correlación observada entre los parámetros seminales evaluados “in vitro” y la fertilidad obtenida “in vivo” fue baja ($P > 0.05$).
- 6) La asociación de 5% de yema de huevo con 2% de glicerol a los diluyentes base UHT e INRA 96®, no generó significativamente mejores porcentajes de fertilidad comparada con la adición de solo 5% de yema.

8. CONSIDERACIÓN FINAL

El agregado de 2% de glicerol a los diluyentes base UHT e INRA 96® que poseen 5% de yema de huevo como único aditivo, aportaría cierto grado de seguridad frente a eventuales fluctuaciones de temperatura en la refrigeración.

9. BIBLIOGRAFÍA



- 1- Aires, V. A.; Hinsch, K. D.; Müller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Müller-Schloesser, S.; Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soy bean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60: 269-279.
- 2- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J. Androl.* 10: 89-98.
- 3- Azzarini, M.; Valledor, F. 1998. Inseminación intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural. *SUL Producción Ovina*. 1: 1-8.
- 4- Bonadonna, T. 1986. *Reproducción Animal e Inseminación Artificial*. Editorial Hemisferio Sur. Tomo 1. 272 pp.
- 5- Bonilla Riera, C. S. 2000. Efecto de la Refrigeración del Semen de Carnero durante 24 horas sobre el transporte espermático. Tesis de Grado. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. Montevideo. Uruguay.
- 6- Bousseau, 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.
- 7- Castrillejo, A.; Rodríguez, H. 1981. Fertilidad del semen de carnero suplementado con prostaglandina F2 alfa. III Jornadas de Ovinos. 1-6. Tacuarembó. Uruguay.
- 8- Cavestany, D. 1994. Procesamiento y congelación de semen de toro. Publicación Santa Catalina. 23 pp.
- 9- Decuadro-Hansen, G.; Magistrini, M.; Batelier, F. 2001. El INRA 96, un diluyente de conservación de semen de padrillo a 4 y 15°C destinado a la inseminación artificial. Congreso Nacional de medicina Veterinaria. Montevideo. Uruguay.
- 10-DICOSE. Sitio web: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE>
- 11-Drobnis E. Z.; Crowe, L. M.; Berger, T.; Anchordoguy, T. J.; Overstreet, J. W.; Crowe, J. H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membrane: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265: 432-437.
- 12-Durán del Campo, A. 1980. *Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Ed. Hemisferio Sur. 264 pp.
- 13-Durán del Campo, A.; Cavestany, D.; Durán - Hontou, G. 1993. *Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Ed. Agropecuaria. Hemisferio Sur. 199 pp.
- 14-Evans, G. Maxwell, W. M. C. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Editorial Butterworths. 194 pp.

- 15-**Eppleston, J.; Maxwell, W. M. C. 1995. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology*. 43: 777-788.
- 16-**Fahy, G. M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*. 23: 1-13.
- 17-** Fernández Abella, D.; Villegas, N.; Bellagamba, M. 1998. Comparación de la fertilidad obtenida con semen ovino conservado a 5°C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. *SUL Producción Ovina*. 11: 51-62.
- 18-** Fernández Abella, D.; Villegas, N. 2000. Efecto del pentobarbital sódico en la fertilidad de semen de carnero conservado a 5°C. Congreso Latinoamericano de Producción Animal.
- 19-** 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. *SUL Producción Ovina*. 14: 55-63.
- 20-** Fiser, P.; Langford, A. 1981. The effect of Sodium Pentobarbital and storage time on preservation of Ram Spermatozoa Motility at 5°C. *Canadian Journal of Animal Science*. 61: 847-851.
- 21-** Foote, R. 1984. Buffers and Extenders. Technical Conference on AI and Reproduction. Colombia. 62-73.
- 22-** Garde, J.; Gutierrez, A.; Artiga, C. G.; Vazquez, I. 1993. Influence of freezing process on in vitro capacitation of ram semen (abstract). *Theriogenology*. 39: 225.
- 23-** Garner, D. L.; Pinkel, D.; Johnson, L. A.; Pace, M. M. 1986. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flowcytometric analysis. *Biol Reprod* 34: 127-138.
- 24-** Garner, D.; Johnson, L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*. 53: 276-284.
- 25-** Gil, J.; Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 54: 93-108.
- 26-** Gil, J. 2002^a. El espermatozoide desde la espermiación hasta la fecundación. En: Reproducción en los animales domésticos. Ed: R.Ungerfeld Melibea Editores. 2002. Montevideo, Uruguay. Tomo I. 93-111.
- 27-** Gil, J. 2002^b. Preservación de Semen Ovino. En Reproducción en los animales domésticos. Ed: R.Ungerfeld Melibea Editores. 2002. Montevideo, Uruguay. Tomo II. pp 365-385.
- 28-** Gil, J.; Rodríguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N. Soderquist, L.; Rodríguez-Martínez, H. 2003^a. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 59: 1157-1170.
- 29-** Gil, J.; Lundeheim, N.; Söderquist, L.; Rodríguez-Martínez, H. 2003^b. Influence of extender, temperature and adition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 59: 1241-1255.
- 30-** Gil, J.; Olivera, J. 2005. Preservación (Refrigeración y Congelación) de semen ovino y su uso en inseminación artificial cervical. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. 55-67.
- 31-** Gil, J.; Fierro, S.; Bielli, A. 2005. Efecto de la oxitocina y vía de

- administración sobre la penetrabilidad del cervix en ovejas en estro. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Sección Posters.
- 32- Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen – thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9: 481-487.
 - 33- Gillan, L.; Maxwell, W. M. C. 1999^a. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J. Reprod Fertil Suppl* 54: 271-283.
 - 34- Gillan, L.; Skovgold, K.; Watson, P. F.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. 1999^b. Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. *Reprod Fertil Dev* 11: 309-315.
 - 35- Gillan, L.; Maxwell, W. M. C.; Evans, G. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod Fertil Dev* 16: 447-454.
 - 36- Hafez, E. 1996. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Editorial Interamericana. 3^a Edición en Español. 542pp.
 - 37- Hammerstedt, R. H.; Graham, J. K.; Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.
 - 38- Hammerstedt, R. H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 5: 675-690.
 - 39- Ijaz, A.; Hunter, A. G.; Graham, E. F. 1989. Identification of the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk –TEST semen extender. *J Dairy Sci* 72: 2700-2706.
 - 40- Lafluf, O.; Chiossoni, M.; Cresci, A.; Rodriguez Martínez, H. 1990. Efecto del pH del diluyente sobre la motilidad y fertilidad del semen de carnero. *Veterinaria*. 26: 4-9.
 - 41- Maxwell, W.; Salamon, S. 1993. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reprod Fertil Dev* 5:613:638.
 - 42- Maxwell, W.; Stojanov, T. 1996. Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of some Antioxidantes. *Reprod Fertil Dev* 8: 1013-1020.
 - 43- Maxwell, W.; Watson, P, 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42: 55-65.
 - 44- Montossi, F.; San Julián, R.; de Mattos, D.; Ferreira, G.; Pérez Jones, J. 1998. Producción de lana fina: una alternativa de valorización de la producción ovina sobre suelos superficiales del Uruguay con escasas posibilidades de diversificación. *INIA Serie Técnica* 102:307-315.
 - 45- Müller-Schlösser, F. 2005. Avances con el uso de diluyentes libres de yema de huevo en la congelación de semen bovino. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba. Argentina. 317-324.
 - 46- Pace, M. M.; Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 39: 1144-1149.
 - 47- 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.
 - 48- Paulenz, H.; Söderquist, L.; Adnoy, T.; Fossen, O. H.; Berg, K. A. 2003. Effect of milk and Tris based extenders on the fertility of sheep

- inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology*. 60: 759-766.
- 49- Robertson, L.; Watson, P. F. 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod Fertil* 77: 177-185.
 - 50- Rodríguez Martínez, H. 1990. Aspectos de la preservación de semen de rumiantes y suinos. XVIII Jornadas Técnicas de Buiatría: E1-E7. Paysandú. Uruguay.
 - 51- Russel, A.J.F; Doney, J.M.; Gunn, R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*. 72: 451-454.
 - 52- Salamon, S.; Maxwell, W. M. C.; Firth, J. H. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Animal Reproduction Science*. 2: 373-385.
 - 53- 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.
 - 54- Salamon, S.; Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
 - 55- Salgado, C. 2004. Producción Ovina: Situación Actual y Perspectivas. En: Seminario de Producción Ovina: Propuestas para el negocio ovino. 29 y 30 de julio. Paysandú. Uruguay. 7-13.
 - 56- Sánchez-Partida L.G.; Setchell, B.P.; Maxwell, W. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9: 689:696.
 - 57- Sánchez-Partida, L.G.; Windsor, D.P.; Eppleston, J.; Setchell, B. P.; Maxwell, W. 1999. Fertility and its relation to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J Androl* 20:280-288.
 - 58- SAS Institute Inc., SAS Procedures Guide, Version 8.3, Cary, NC: SAS Institute Inc, 2000.
 - 59- SCMAU-SUL-INIA-MGAP. 2004. Proyecto Merino Fino del Uruguay: Fases I y II. Segunda evaluación genética poblacional de animales de la raza Merino Australiano en el Uruguay. Sumario de Padres 1995-2003. Boletín de divulgación: Día de Merino Fino. 17 de febrero de 2004.
 - 60- Sigel, S. 1956. Nonparametric statistic for the behavioral sciences. International student edition, 313 pp.
 - 61- Slavik, T. 1987. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona -free hamster eggs. *J Reprod Fertil* 79: 99-103.
 - 62- Smith, R. L.; Berndtson, W. E.; Unal, M. B.; Pickett, B. W. 1978. Influence of Percent Egg Yolk during Cooling and Freezing on Survival of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci* 62: 1297-1303.
 - 63- SUL (Secretariado Uruguayo de la Lana). Sitio web: <http://www.sul.org.uy>
 - 64- Thibier, M.; Guerin, B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 233-251.
 - 65- Upreti, G. C.; Jensen, K.; Oliver, J. E.; Duganzich, D. M.; Munday, R.; Snith, J. F.; 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 48: 269-278.
 - 66- Upreti, G.C.; Jensen, K.; Munday, R.; Duganzich, D. M.; Vishwanath, R.; Snith, J. F. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram

- spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci* 51: 275-287.
- 67- Van Wagtendonk-de Leeuw, A. M.; Haring, R. M.; Kaal-Lansbergen, L. M.; den Daas, J. H. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*. 54: 57-67
 - 68- Vishwanath, R.; Shannon, P. 1997. Do sperm cells age ?. A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 9: 321-331.
 - 69- Watson, P. F.; Martin, I. C. 1973. The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196°C . *Aust J Biol Sci* 26: 927-935.
 - 70- 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
 - 71- Watson, P. F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 62: 483-492.
 - 72- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60: 481-492.
 - 73- White, I. G. 1993. Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: a Review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.
 - 74- Windsor, D. P. 1997^a. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Dev* 9: 279-284.
 - 75- Windsor, DP. 1997^b. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination in Merino ewes. *Anim Reprod Sci* 47: 21-29.

10. ANEXOS

Cuadro N° II. Organigrama de la Fase 1 (Estudios In vitro)

| | Actividad |
|--------------|---|
| Día 1 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Envasado. Enfriamiento. ▪ Evaluación hora 0 y 12 pool día 1 |
| Día 2 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Envasado. Enfriamiento. ▪ Evaluación hora 0 y 12 pool día 2. ▪ Evaluación hora 24 pool día 1. |
| Día 3 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Envasado. Enfriamiento. ▪ Evaluación hora 0 y 12 pool día 3. ▪ Evaluación hora 24 pool día 2. ▪ Evaluación hora 48 pool día 1. |
| Día 4 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Envasado. Enfriamiento. ▪ Evaluación hora 0 y 12 pool día 4. ▪ Evaluación hora 24 pool día 3. ▪ Evaluación hora 48 pool día 2. ▪ Evaluación hora 72 pool día 1. |
| Día 5 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Envasado. Enfriamiento. ▪ Evaluación hora 0 y 12 pool día 5. ▪ Evaluación hora 24 pool día 4. ▪ Evaluación hora 48 pool día 3. ▪ Evaluación hora 72 pool día 2. |
| Día 6 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Envasado. Enfriamiento. ▪ Evaluación hora 0 y 12 pool día 6. ▪ Evaluación hora 24 pool día 5. ▪ Evaluación hora 48 pool día 4. ▪ Evaluación hora 72 pool día 3. |
| Día 7 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Evaluación hora 24 pool día 6. ▪ Evaluación hora 48 pool día 5. ▪ Evaluación hora 72 pool día 4. |
| Día 8 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Evaluación hora 48 pool día 6. ▪ Evaluación hora 72 pool día 5. |
| Día 9 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Evaluación hora 72 pool día 6. |

Cuadro III. Organigrama de la Fase 2 (Estudios In vivo)

| | Actividad |
|--|---|
| Día 1 | <ul style="list-style-type: none">▪ Apartar ovejas en celo natural.▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool Dilución.▪ IA con diluyente Control (dilución en Leche descremada UHT sin refrigerar).▪ Preservación de las demás muestras seminales en los diferentes diluyentes por 24 horas a 5° C. |
| Día 2 | <ul style="list-style-type: none">▪ Apartar ovejas en celo.▪ IA con el semen diluido y preservado por 24 horas a 5°C.▪ Extracción seminal. Evaluación. Formación del pool. Dilución.▪ IA con diluyente Control (dilución en Leche descremada UHT sin refrigerar).▪ Preservación de las demás muestras seminales en los diferentes diluyentes por 24 horas a 5° C. |
| Idem hasta completar 150 servicios por diluyente | |

10.1 DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO

Integridad de Membrana

Se adicionan 5 µl de SYBR-14 y 2.5 µl de Yoduro de Propidio a 50 µl de semen refrigerado. La mezcla se homogeneiza suavemente y se incuba por 15 minutos a 35–37 °C. El frotis se prepara colocando 4 µl del semen teñido sobre un portaobjeto templado. Antes de la evaluación se le adiciona 1 µl de Glutaraldeído al 1% para disminuir la motilidad de los espermatozoides y facilitar el conteo.

Estado de Capacitación de Membrana

Se incuban 18 µl del semen refrigerado por 10 minutos a 35-37°C con 2.5 µl de Yoduro de Propidio. Se adicionan a la mezcla 20 µl de Clortetraciclina. Se fija la muestra con 5 µl de Glutaraldeído al 3 %. El preparado se sella y se mantiene a 4°C a la oscuridad hasta 24 horas previas a su evaluación.