

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**IA CERVICAL CON SEMEN CONGELADO EN OVINOS
EVALUACIÓN DE MOTILIDAD SUBJETIVA Y FERTILIDAD**

por

**Maria Virginia TEIXEIRA ESTIGARRIBIA
Juan Martín GAMARRA ETCHEVERRY**



TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias.
(Orientación Producción Animal)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2007**

078 TG
IA cervical con
Teixeira, M



FV/27508

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Daniel Cavestany

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Jorge Gil

Tercer miembro:

Dr. Álvaro López

Cuarto Miembro (Co Tutor)



Dr. Julio Olivera Muzante

Fecha:

21 de diciembre de 2007

Autores:

Teixeira Estigarribia, Maria Virginia

Gamarra Etcheverry, Juan Martín

AGRADECIMIENTOS

A la familia Filliol Barreiro, quienes permitieron utilizar su establecimiento y proporcionaron los animales para el ensayo.

A todo el personal del establecimiento "Piedra Mora" por su colaboración en el trabajo.

Al Dr. Sergio Fierro y a la Br. Ana Araujo por su colaboración en el trabajo.

A la Dra. Carolina Viñoles por realizar las ecografías.

Al Dr. Fernando Vila por su colaboración en el procesamiento estadístico de los datos.

Al Dr. Gustavo Decuadro Hansen, Laboratorio IMV, L'Aigle, France por la donación de materiales de trabajo.

Al Laboratorio DILAVE "Miguel C. Rubino" Paysandú, por las instalaciones para el ensayo *in Vitro*.

A la Universidad de la Republica, por la financiación del trabajo e inversiones realizadas (Proyecto CSIC Mod 2 N° 600/6010).

Al Dr. Rodolfo Ungerfeld por cedernos el espacio físico para las reuniones de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	1
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	2
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</u>	5
4.1. INSEMINACIÓN POR VÍA CERVICAL Y CONGELACIÓN DE SEMEN OVINO.....	5
4.2. DILUYENTES PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN.....	5
<u>Sustancias que componen la base de los diluyentes</u>	6
<u>Protección del espermatozoide durante el enfriamiento y congelación</u>	7
<u>Método de incorporación del glicerol</u>	8
4.3 EFECTOS DE LA PRESERVACIÓN SOBRE EL ESPERMATOZOIDE.....	9
5. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	12
5.1. FASE 1: PRODUCCIÓN DE DOSIS DE SEMEN CONGELADO.....	12
5.1.1. <u>Colecta y evaluación de semen</u>	12
5.1.2. <u>Extensores y procesamiento del semen</u>	12
5.1.2.1. Extensores (diluyentes).....	12
5.1.2.2. Protocolos de procesamiento	13
5.1.3. <u>Evaluación post descongelación</u>	14
5.1.4. <u>Análisis estadístico</u>	14
5.2. FASE 2: INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	14
5.2.1. <u>Detección de ovejas en celo</u>	14
5.2.2. <u>Inseminación con semen fresco (Control)</u>	15
5.2.3. <u>Inseminación con semen congelado (Tratamientos)</u>	15
5.2.4. <u>Evaluación de resultados</u>	16
5.2.4.1. Tasa de No Retorno a los 21 días de servicio	16
5.2.4.2. Tasa de preñez	16
5.2.5. <u>Análisis estadístico</u>	16
6. <u>RESULTADOS</u>	17
6.1. FASE 1: PRODUCCION DE DOSIS DE SEMEN CONGELADO COLECTA Y EVALUACION	17

6.1.1. <u>Motilidad espermática subjetiva</u>	17
6.2. FASE 2: INSEMINACION ARTIFICIAL	18
6.2.1. <u>Tasa de No Retorno a los 21 días de servicio</u>	18
6.2.2. <u>Resultados de tasa de preñez</u>	18
6.2.3. <u>Fertilidad día a día Control vs. Congelado</u>	19
6.2.4. <u>Variables factor</u>	19
6.2.4.1. Estado corporal	19
6.2.4.2. Color de mucus cervical	19
6.2.4.3. Cantidad de mucus cervical	19
6.2.4.4. Profundidad de IA	20
6.2.4.5. Lluvias	20
7. <u>DISCUSIÓN</u>	21
8. <u>CONCLUSIONES</u>	25
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	26

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
<u>Cuadro N°1</u>	17
<u>Cuadro N°2</u>	17
<u>Cuadro N°3</u>	18
<u>Figura N°I</u>	18
<u>Figura N°II</u>	19

1. RESUMEN

En el presente trabajo, 5 bases de diluyentes de semen de carnero combinados con 2 protocolos de procesamiento (dilución en 1- o 2-pasos) fueron evaluados *in-vitro* (motilidad subjetiva) al descongelado (Total: 10 tratamientos). De acuerdo a los resultados, 3 de ellos con sus respectivos protocolos de procesamiento (Total: 6 tratamientos) fueron seleccionados para continuar su estudio *in-vivo*, mediante inseminación artificial vía cervical en ovejas. Todos los tratamientos de preservación de semen congelado (-196°C) presentaron menor fertilidad que el grupo control (semen fresco diluido en condiciones similares de volumen, presentación y concentración que el semen congelado). Se encontraron diferencias significativas de fertilidad entre los diluyentes INRA 96, UHT, TRIS comercial y los diferentes protocolos de procesamiento en 1 o 2 pasos de dilución (3%, 1%, 8%, 13%, 18%, 15%, respectivamente) así como con el grupo control (67%). La fertilidad del TRIS comercial con su protocolo de procesamiento en 1 paso (18%) fue superior a los demás diluyentes y protocolos; aunque para la leche UHT el mejor resultado se dio con el protocolo de 2 pasos. Por lo tanto el protocolo de procesamiento que favorecería los resultados depende del diluyente utilizado. Los diluyentes que presentaron mejor performance *in-vitro* fueron superiores *in-vivo*.

2. SUMMARY

Five base extenders combined with 2 processing protocols (1 or 2 step extension) for frozen preservation of ram semen were assessed *in-vitro* by post thaw subjective motility (Total: 10 treatments). According to the results, three of them with their respective processing protocol, 1 or 2 steps (Total: 6 treatments) were selected to be tested *in-vivo* by cervical artificial insemination in ewes. All treatments for preserving frozen ram semen (-196°C) achieved lower fertility than control group (fresh semen extended in similar conditions of volume, presentation and concentration per dose as the frozen semen). There were significant differences of fertility results after AI with semen frozen in INRA 96, UHT, commercial TRIS and their different processing protocols 1 or 2 step extension (3%, 1%, 8%, 13%, 18%, 15%, respectively), as with the control group (67%). The fertility of commercial TRIS in 1 step processing protocol (18%) was superior than the other extenders and protocol; however UHT milk achieved better fertility results with 2 step extension protocol. Thus, the processing protocol that obtains better results depends on the extender used. The extenders that had a better performance *in-vitro* were superior *in-vivo*.

3. INTRODUCCIÓN

A partir de la década del 90 se ha producido un marcado descenso en el stock ovino nacional en respuesta a una fuerte y constante disminución en los precios de la lana en el mercado 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 aportó el mayor ingreso de divisas al país dentro de los productos ovinos (74% de las exportaciones de productos ovinos, SUL). Hoy en día, los productores apuestan a estabilizar y aumentar el stock ovino incrementando así los ingresos de este rubro.

Dentro de este marco, se ha impulsado la producción de lanas “Súper Finas” mediante un programa de mejora genética llevado adelante por el proyecto “Producción de Lanos Finas y Superfinas en el Uruguay”, iniciado en el año 1998 por la Sociedad de Criadores de Merino Australiano del Uruguay junto a otras instituciones como el SUL y el INIA (Montossi y col, 1998; Proyecto SCMAU-SUL-INIA). Actualmente, se promueve a partir de un núcleo elite y varios planteles, la producción de reproductores objetivamente superiores en finura para proporcionar padres certificados a las majadas multiplicadoras y generales (SCMAU-SUL-INIA-MGAP, 2007).

El progreso genético a alcanzar en este programa (“Producción de Lanos Finas y Superfinas en el Uruguay”), está ligado a la difusión masiva de genes mejoradores en la majada general, como así también, a acortar el intervalo generacional entre los carneros padres utilizados en los planteles de elite y sus hijos en las majadas multiplicadoras y comerciales. Las tecnologías disponibles para favorecer el desarrollo de este programa tienen como base a la inseminación artificial (IA), la cual está estrechamente relacionada con el desarrollo de las técnicas de preservación de semen de los carneros. Esto favorece un uso más eficiente y prolongado de los carneros superiores y de referencia que conectan diferentes majadas, hecho que es crucial en un programa de selección (Gil y Olivera, 2005).

Estos carneros son sometidos a condiciones de stress que en muchas ocasiones se tornan perjudiciales para la calidad seminal interfiriendo con el objetivo a alcanzar. Generalmente deben ser trasladados entre cabañas con el fin de cumplir sus servicios lo que implica un riesgo físico y sanitario para el reproductor, además del riesgo sanitario implícito en el movimiento de animales entre predios. La tecnología disponible para evitar esos traslados de carneros se basa en la preservación del semen, ya sea por periodos breves (semen refrigerado) o por periodos más largos (semen congelado). La preservación con semen congelado permite maximizar la producción de dosis de semen, que posteriormente pueden ser utilizadas en planteles o majadas comerciales, acelerando el progreso genético al utilizarse dosis de carneros padres altamente demandados durante la temporada de servicios.

El semen congelado ha sido probado en diversos estudios desde hace mucho tiempo, no siendo muy alentadores sus resultados de fertilidad cuando se ha utilizado en IA por vía cervical (Salamon y Maxwell, 1995a). Esta situación es diferente cuando el semen es depositado en forma intrauterina por vía laparoscópica o transcervical. Sin embargo, este método requiere de un equipo de alta especialización, mayores costos, más tiempo por oveja y mayor grado de adiestramiento que la IA por vía cervical (Campbell y col, 1996). Es además, una técnica quirúrgica, en ocasiones rechazada por los productores y por las normas de “bienestar animal”. Por esta razón, se hace difícil la masificación del uso del semen

congelado en condiciones de cría extensiva como las de nuestro país, lo cual motiva a continuar con el estudio de diferentes diluyentes y métodos de congelación, con el objetivo de mejorar los resultados de fertilidad al utilizar el semen congelado en IA por vía cervical.

Para este fin, se han estudiado gran cantidad de diluyentes a nivel nacional e internacional, en base a productos naturales como por ejemplo, leche, lactosa, yema de huevo, etc. (Fernández Abella y col, 1998, Salamon y Maxwell, 1995a,b; 2000) o sintéticos como el Tris, Citrato (Maxwell y Salamon, 1993, 1995ab; Gil y col, 2001; Paulenz, 2004).

La IA cervical con semen congelado reporta resultados muy variables entre trabajos (10-60%) (Salamon y Maxwell, 1995a,b; 2000). Existen reportes escandinavos informando resultados de fertilidad de 50-60% (Olafsson, 1980; Lillo, 1984; Grotte, 1992; Olesen, 1993; Andersen Berg, 1999; Söderquist y col., 1997; 1999), aunque también de la misma región (Holm y col., 2000), se reportan resultados similares a los obtenidos en otras partes del mundo (20%). A nivel nacional se han publicado diferentes estudios acerca del uso de semen congelado (Azzarini y Valledor, 1988), en los cuales la IA intrauterina ha prevalecido sobre otras técnicas como la cervical en cuanto a los resultados de fertilidad, siendo los resultados de la IA cervical con semen congelado hasta el momento, poco estimulantes para su masificación. Los resultados obtenidos en la raza Corriedale oscilan el 10% (Duran del Campo, 1980; Azzarini y Valledor, 1988), hasta valores de 20 a 30% (Gil y col., 2002; 2003). En la raza Merino Australiano la información nacional no es abundante, entre 10 y 20% con vía cervical, 30% por vía transcervical (de Nava, citado por Gil y Olivera, 2005) y 38.5% por vía intrauterina (Fernández Abella, 2003).

Otro punto a considerar en la preservación de semen es el método de dilución o de agregado del diluyente (conteniendo glicerol como agente crioprotector). Este puede ser agregado en 1 solo paso o en 2 pasos (Evans y Maxwell, 1987). El método de 1 paso implica diluir el semen agregando el diluyente conteniendo el glicerol a 30-37°C, el cual es práctico, exitoso y ampliamente utilizado como método de dilución de semen de carnero para su congelación ("método australiano") (Salamon, 1976; Evans y Maxwell, 1987). Otros autores recomiendan el método de 2 pasos, lo que implica que se deban hacer 2 fracciones del diluyente, la primer fracción sin glicerol (agregada a 30-37°C) y la segunda fracción con el doble de concentración final de glicerol (agregada a 5°C). El objetivo de este método de dilución es minimizar el efecto tóxico del glicerol cuando se agrega mientras el metabolismo espermático es aún elevado; sugerido por Colas (1975), por encima del 4% de concentración de glicerol en el diluyente, también observado por Fiser y Fairfull en 1984. Esto se lograría con el agregado de la segunda fracción del diluyente (la cual contiene glicerol), a 2-4°C (Hill y col., 1959; First y col., 1961; Lopatko, 1962, 1963; Feredean y Bragaru, 1964; citados por Salamon y Maxwell, 1995). Contrariamente a esta recomendación, Salamon (1968) y Lightfoot y Salamon (1969), reportan que el método de 1 paso (agregar el diluyente conteniendo el glicerol a 30-37°C) era tan bueno como el de 2 pasos, y que los diferentes resultados dependen del azúcar y del buffer que componen el diluyente.

Debido a la variedad de resultados publicados sobre el método de dilución en 1 (Lightfoot y Salamon, 1969; Salamon, 1976, Evans y Maxwell, 1987) o 2 pasos (Andersen, 1972; Colas, 1975; Graham y col, 1978; Grotte y col, 1992), se hace necesario realizar ensayos sobre este tema, lo que permitirá generar más información de estas técnicas en el país, así como diferentes diluyentes y métodos

de extensión especialmente en el caso de la raza Merino Australiano, bajo las condiciones extensivas de explotación del basalto, que es donde se desarrolla en forma mayoritaria el programa de producción de lanas finas y extra-finas de nuestro país.

El objetivo general del trabajo fue estudiar el efecto de diferentes diluyentes y del método de procesamiento en la preservación de semen de carnero, sobre la fertilidad al realizar IA por vía cervical.

Los objetivos específicos fueron:

I) Comparar el efecto de diferentes diluyentes: comerciales (Bioexcell®, INRA-96®, y Rojo -IMV, L'Aigle, France-) y caseros (TRIS -diluyente australiano-, leche UHT -diluyente noruego-), combinado con dos protocolos de procesamiento (1 ó 2 pasos) para la preservación de semen de carnero de la raza Merino Australiano.

II) Evaluar la calidad espermática resultante mediante determinación de la motilidad subjetiva (MS) al descongelado (estudio "*in-vitro*")

III) Evaluar la fertilidad vía IA cervical (estudio "*in-vivo*"), de los protocolos que presenten mejores resultados a la evaluación *in-vitro*, en las condiciones de producción extensiva ovina características del Basalto.

4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA



4.1 INSEMINACIÓN POR VÍA CERVICAL Y CONGELACIÓN DE SEMEN OVINO

La oveja puede ser inseminada por el método vaginal ("disparar a oscuras"), cervical (depositando el semen dentro del cervix), o por inseminación intrauterina por laparoscopia. La inseminación por vía cervical es el método que se utiliza mayoritariamente en los ovinos por ser una técnica sencilla y de bajo costo, aunque los resultados de fertilidad obtenidos al combinarla con semen congelado, son bajos (Evans y Maxwell, 1987).

La congelación de semen es la técnica de elección para la conservación de semen en bovinos, dado que los resultados de fertilidad son ampliamente satisfactorios. En el caso de los ovinos, esta técnica genera cambios a nivel de la célula espermática, que provocan un deficiente pasaje de los espermatozoides a través del cervix de la oveja, siendo esta una de las principales causas de los bajos resultados de fertilidad al inseminar por vía cervical con semen congelado. Sin embargo, pueden alcanzarse altas tasas de fertilidad realizando la deposición del semen descongelado directamente en el útero mediante laparoscopia (Eppleston y Maxwell, 1993). Un trabajo nacional de Azzarini y Valledor en el año 1988, muestra que se obtuvieron bajos resultados de fertilidad cuando se combinó la inseminación cervical con semen congelado, situación que se vio modificada cuando la inseminación fue intrauterina, alcanzando con esta técnica mayores resultados de fertilidad.

El plasma seminal por si solo, provee una limitada protección al espermatozoide frente a los cambios de temperatura. Para lograr el almacenamiento del semen a -196°C , se hace imperiosa su dilución o extensión en diluyentes especiales (Salamon y Maxwell, 1995a).

4.2 DILUYENTES PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN

Los diluyentes son sustancias que se adicionan al semen con el fin de brindarle al espermatozoide las condiciones necesarias para mantener su viabilidad y su capacidad de fertilización durante todo el proceso de enfriado, congelación y descongelación. Debido a las alteraciones que puede sufrir el espermatozoide durante todo el proceso de preservación, los diluyentes deben reunir ciertas características y requisitos, con el fin de cumplir con su función.

Como primer punto, estas sustancias deben aportar nutrientes al espermatozoide, situación que se cumple mediante el agregado de carbohidratos al diluyente. El plasma seminal posee fructosa, aunque la célula espermática también puede utilizar otros carbohidratos como la glucosa o la manosa (Maxwell y Salamon, 1993). Si no se realiza el agregado de sustratos energéticos, se produce una oxidación de los fosfolípidos intracelulares, lo que provoca la producción de agentes que dañan a la célula (Foote, 1984).

En segundo lugar, los diluyentes deben tener la capacidad de mantener el pH del medio en un rango que oscila entre 6,5 y 7,5. Esto implica que se deban agregar sustancias buffers o tampón, las cuales pueden ser orgánicas o inorgánicas. Dentro de los orgánicos se encuentra el Tris (hidroximetil amino metano) como uno de los

más utilizados, siendo los citratos los utilizados más frecuentemente del grupo de buffers inorgánicos. A nivel nacional un estudio de Fernandez Abella y col. (1998) demuestra que la viabilidad espermática fue mayor cuando el pH del diluyente fue 7 mientras que con pH menor ésta se vio afectada.

Diversos microorganismos pueden ser vehiculizados en el semen, lo que implica que deban agregarse al diluyente antibióticos con el fin de controlar el desarrollo de diversas bacterias (Thibier y Guerin, 2000). También la yema de huevo puede actuar como fuente de recursos para el crecimiento microbiano (Cavestany, 1994). Con este propósito se utiliza una combinación de penicilina y estreptomina, la cual brinda un control antibacteriano de amplio espectro (Hafez, 1996; Cavestany, 1994).

Una de las funciones más importantes de un diluyente es tratar de minimizar las acciones perjudiciales que sufre la célula espermática durante el proceso de enfriamiento. Este proceso implica la reducción de la temperatura en la cual se encuentra el semen diluido, llegando a los 5°C. Se genera una alteración de la membrana del espermatozoide (White, 1993) y también de las membranas de los organelos, lo que redundará en una alteración de la fluidez y la permeabilidad selectiva (Hammerstedt y col., 1990). Por esta razón, deben agregarse al diluyente lípidos, lecitinas, proteínas y lipoproteínas, los cuales son los encargados de prevenir lo más posible estos perjuicios (Maxwell y Salamon, 1993; Cavestany, 1994). Estos elementos son aportados principalmente por la yema de huevo y la leche. El procurar realizar el proceso de descenso de temperatura en un tiempo de aproximadamente 1,5 a 2 horas, también busca llevar al mínimo posible las consecuencias del impacto por frío (Evans y Maxwell, 1987).

Sustancias que componen la base de los diluyentes

Varios elementos han sido utilizados como base en la composición de los diluyentes. Dentro de estos, los más empleados han sido el TRIS, Citrato y leche de vaca. El TRIS es un buffer orgánico altamente utilizado como base en la elaboración de los diluyentes para la congelación de semen. Un ejemplo de diluyente para la congelación de semen de carnero en base a TRIS, es el elaborado por Salamon y Visser (1972), el cual es altamente utilizado y recomendado (Evans y Maxwell, 1987; Salamon y Maxwell, 2000). La composición de este diluyente es: TRIS (hidroximetil amino metano), Glucosa (aporte de sustratos energéticos), Acido Cítrico, Yema de huevo (protector durante el proceso de enfriamiento), Glicerol (agente crioprotector), Penicilina y Estreptomina, Agua destilada (Evans y Maxwell, 1987). Otra sustancia empleada como base en la elaboración de un diluyente es el Citrato, el cual es un buffer inorgánico, y al igual que el TRIS, actúa neutralizando los cambios de pH producidos por la formación de ácido láctico, el cual es el resultado de la metabolización de la glucosa por parte de los espermatozoides (Cavestany, 1994).

Debido a su facilidad de obtención y bajo costo, la leche de vaca ha sido ampliamente utilizada en la elaboración de diluyentes a nivel de campo (Evans y Maxwell, 1987). Este producto natural, se ha empleado en forma entera, descremada o reconstituida (en polvo). Previo a su uso, debe ser sometida a calentamiento a 92 - 95°C por 10 minutos, luego se deja enfriar y se repite el procedimiento 2 o 3 veces más. Esta operación es denominada Tyndalización y su cometido es la destrucción de las lacteninas, que son elementos espermicidas (Evans y Maxwell, 1987; Cavestany, 1994; Salamon y Maxwell, 2000). Se ha atribuido el éxito de la leche como diluyente, a la fracción proteica de la misma

(caseína), la cual actuaría como protector del espermatozoide durante el descenso de la temperatura (prevención del "shock" por frío), neutralizando los cambios de pH (buffer) y como agente quelante ante la presencia de metales pesados (Salamon y Maxwell, 2000). En los últimos años, ha aumentado el uso de la leche UHT, puesto que es un producto estéril y que su proceso, implica un calentamiento que asegura la inactivación de las lacteninas (Evans y Maxwell, 1987; Cavestany, 1994; Salamon y Maxwell, 2000).

Protección del espermatozoide durante el enfriamiento y congelación

La función de proteger a la célula espermática durante el descenso de temperatura y la congelación, implica el agregado de sustancias que cumplan ese cometido. Dentro de éstas, las dos más utilizadas son la yema de huevo y el glicerol.

Desde el año 1939, cuando Phillips demostró el efecto positivo de la yema de huevo en la preservación seminal, ésta se ha constituido en un componente masivamente utilizado en la elaboración de diluyentes para la congelación de semen (Salamon y Maxwell, 1995a). Se debe utilizar yema de huevos que no tengan más de 4 o 5 días de puestos (Evans y Maxwell, 1987). La yema de huevo le confiere protección a la membrana celular del espermatozoide, a través de la fracción lipoproteica de baja densidad (LDF) (Watson, 1976, citado por Salamon y Maxwell, 1995a). Según Watson (1981), tanto la fracción lipoproteica de baja densidad (LDF) como los liposomas de la lecitina aportaron igual grado de protección al espermatozoide frente al shock por frío, aunque la LDF fue superior a la lecitina durante la conservación del semen refrigerado. Si bien la yema de huevo, ayuda a preservar la integridad de la membrana celular y de los organelos (Salamon y Maxwell, 1995a), ésta también puede actuar como factor capacitante (Ijaz y col., 1989), hecho que podría considerarse perjudicial, ya que reduciría el tiempo de vida del espermatozoide una vez descongelado. Sumado a esto, por ser un producto de origen animal, su utilización podría implicar ciertos riesgos como la presencia de microorganismos patógenos o residuos farmacológicos, lo que ha generado la elaboración de diluyentes que no presenten yema de huevo en su formulación (Müller-Schlösser, 2005). Ciertos diluyentes comerciales han sido elaborados con lecitina de soya como sustituto de la yema de huevo. Diversos han sido los resultados al comparar estos diluyentes libres de yema de huevo con diluyentes que incluyen a este producto en su composición. Algunos de estos resultados son: la utilización de un diluyente sin yema de huevo comparado a uno en base a leche y yema de huevo no generó diferencias significativas en la fertilidad de semen de toro congelado (Bousseau, 1998); se obtuvieron mayores % de fertilidad con semen de toro cuando se utilizó un diluyente en base a lecitina de soya frente a uno en base a Tris y yema de huevo en la congelación (Aires y col. 2003); se produjo un descenso en la tasa de no retorno a los 56 días cuando se congeló semen de toro con un diluyente libre de yema de huevo frente al semen congelado con un diluyente en base a Tris con 20% de yema de huevo (Van Wagendonk-de Leeuw y col., 2000). En base a lo expuesto anteriormente sobre los riesgos sanitarios que puede acarrear el uso de yema de huevo, se ha promovido la elaboración de diluyentes conteniendo yema de huevo en polvo, la cual puede ser pasteurizada (Marco Jiménez y col., 2004). La yema de huevo fue evaluada como el principal agente crioprotector en la composición de un diluyente para la congelación de semen (Pace y Graham, 1974).

Sin embargo, Gil y col. (2003) encontraron un efecto negativo sobre la evaluación seminal, al utilizar porcentajes de yema de huevo mayores a 10%.

Aunque la yema de huevo, ha sido en ocasiones sustituida por otras sustancias con un efecto similar, es aún considerada como un componente fundamental en la elaboración de diluyentes para la congelación de semen de carnero, debido particularmente a su efecto protector sobre la membrana plasmática (Salamon y Maxwell, 2000).

Todo diluyente que sea elaborado para la congelación de semen, debe incluir en su formulación un agente crioprotector (Evans y Maxwell, 1987). El glicerol es el agente crioprotector más comúnmente utilizado en los diluyentes para la preservación de semen congelado de carnero (Salamon y Maxwell, 2000). Con el propósito de brindar crioprotección al espermatozoide, diversas sustancias han sido estudiadas, siendo el glicerol la que mejores resultados ha brindado hasta el momento (Evans y Maxwell, 1987). La vía por la cual el glicerol brinda protección a la célula espermática, es mediante su propiedad de unirse a las moléculas de agua, evitando la formación de cristales de hielo (Salamon y Maxwell, 1995a). Aparentemente, el glicerol penetraría al espermatozoide de carnero con mayor facilidad que al espermatozoide de toro (Nauk y col., 1970, citado por Salamon y Maxwell, 2000). Según Graham y col. (1978) (citado por Salamon y Maxwell, 2000) cuando se utilizaron porcentajes de glicerol superiores a 6%, se encontró una disminución en la supervivencia de los espermatozoides al descongelado. Si bien el glicerol le confiere crioprotección a la célula espermática, también le ocasiona daño estructural durante las etapas previas a la congelación (Salamon y Maxwell, 2000). Se ha procurado disminuir la proporción de glicerol en los diluyentes para congelar semen de carnero, debido a la toxicidad de este agente crioprotector (Fahy, 1986). Sin embargo, según Pace y Graham, (1974), existe un efecto sinérgico entre la adición de glicerol y la yema de huevo, logrando con la combinación de ambos los mejores resultados de supervivencia espermática luego del descongelado. Esto indica, que la utilización de más de un elemento con funciones de crioprotección, permite disminuir la cantidad relativa de cada uno.

Método de incorporación del glicerol

El glicerol puede ser agregado al semen en un solo paso, agregando un diluyente que contenga la concentración final del glicerol (1 paso), o en dos fracciones de diluyente, una fracción inicial sin glicerol y la segunda fracción conteniendo el doble de la concentración final de glicerol (2 pasos) (Evans y Maxwell, 1987).

Como ejemplo de dilución en un paso, Evans y Maxwell (1987) describen y recomiendan para la dilución de semen de carnero el "método australiano" en base a TRIS, con el agregado de ácido cítrico (como anti oxidante), glucosa (como fuente de energía), yema de huevo (como protector de enfriado), glicerol (como crioprotector), agua destilada y antibióticos. Esta formulación ha sido ampliamente probada para la congelación de semen de carnero en pastillas o "pellets" en Australia, y con alguna modificación de proporciones, en pajuelas. Los resultados logrados tras la IA cervical con semen congelado de ésta forma son muy variables, entre 10 y 50% (Azzarini y Valledor 1988, Salamon y Maxwell, 1995ab). Por diferentes motivos (tasa semen/diluyente, identificación, sanidad, transporte etc.), la presentación en pajuelas es de interés cuando se piensa en la mejora de la calidad seminal para uso vía cervical y en el comercio internacional del material preservado.

Existe en el mercado una versión comercial del diluyente en base a TRIS, llamado Diluyente Rojo® (IMV, L'Aigle, France), desarrollado específicamente para la preservación de semen ovino que tiene la ventaja de presentar uniformidad en su composición, disminuyendo la variabilidad de los resultados. El Bioexcell® (IMV, L'Aigle, France) es un diluyente comercial que tiene, además de la ventaja mencionada para el diluyente Rojo® (IMV, L'Aigle, France), la cualidad de libre de aditivos de origen animal, evitando así el riesgo de contaminación asociada a la yema de huevo, la cual es sustituida por lecitina de soya. Ha sido desarrollado para la congelación en 1 paso de semen de toros, y existe poca información en semen de carnero. Un trabajo nacional reporta resultados variables (20 a 40% de fertilidad) en IA cervical con el Bioexcell®, aunque procesado en 2 pasos (Gil y col., 2003).

Como ejemplo de dilución en 2 pasos, Grotte (1992) y Andersen (1972) recomiendan la leche descremada e inactivada, suplementada con yema de huevo (5%), fructosa y glicerol (en la segunda fracción diluyente, al doble de la concentración final) como base para congelar el semen de carnero en pajuelas francesas (0.25 mL). Los resultados (40-60%) reportados por investigadores escandinavos tras la IA cervical con semen congelado en estos diluyentes son muy atractivos. El INRA-96® (IMV, L'Aigle, France) es un diluyente en base a leche ultra filtrada que ha sido desarrollado para la preservación aeróbica enfriada (15°C) y anaeróbica refrigerada (5°C) de semen equino (Decuadro-Hansen y col., 2001). No se sabe cuál sería el resultado como base de un diluyente para la congelación de semen de carnero. Debido a que el Diluyente Rojo® está diseñado para dilución en un paso, una forma de procurar la primera fracción (sin glicerol) es la utilización del Diluyente Verde® (IMV, L'Aigle, France), que según la información aportada por el fabricante es también en base de TRIS libre de glicerol (Decuadro Hansen, com. per.). Lo mismo sucede con el Bioexcell®, para lo cual se ha logrado obtener una preparación especial en dos fracciones (una libre de glicerol y otra con el doble de la concentración final).

Nuevas herramientas están siendo estudiadas con el fin de mejorar las condiciones a las que son sometidos los espermatozoides durante el proceso de preservación a -196°C. Dentro de ese contexto, la adición de trealosa o albúmina sérica bovina (en sustitución de la yema de huevo) en el diluyente para la incubación de semen congelado-descongelado, ha probado mejorar las características *in vitro* del mismo (Matsuoka y col., 2006). La incorporación de plasma seminal al diluyente para la incubación del semen luego del descongelado, mejoró las características de motilidad e integridad de membrana (*in-vitro*), pero no así la fertilidad (*in-vivo*), luego de IA cervical o intrauterina (El Hajj Ghaoui y col., 2007a, b; O'Meara y col., 2007). Contrariamente a esto Gillan y col. (1999), obtuvieron mejoras *in-vivo* en los resultados de fertilidad al inseminar con semen congelado por vía cervical con suplementación de plasma seminal al medio de resuspensión (28 vs. 51% para semen sin suplementar y suplementado con plasma seminal, respectivamente).

4.3 EFECTOS DE LA PRESERVACIÓN SOBRE EL ESPERMATOZOIDE

El proceso de congelación y descongelación provoca en el espermatozoide una serie de alteraciones que afectan parámetros como la motilidad, estructura

espermática, viabilidad, resultando en una reducción de la fertilidad al inseminar con semen congelado por vía cervical (Salamon y Maxwell, 1995b).

A pesar de que una proporción relativamente alta de espermatozoides de carnero (40-60%) mantiene la motilidad una vez descongelados, solo un 20-30% se encuentra sin daño estructural. Esto demuestra que un espermatozoide puede mantener su motilidad, pero a causa de las alteraciones sufridas, perder la capacidad de fertilizar el óvulo (Salamon y Maxwell, 2000). La alteración de la motilidad, provoca que el transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra se vea afectado, lo cual se considera una de las causas que afectan la fertilidad del semen congelado por vía cervical (Gillan y col., 2004). Cuando se produce la deposición del semen descongelado en el útero, se han obtenido altos porcentajes de óvulos fertilizados (85-95%), demostrando la relevancia de la alteración del transporte espermático (Salamon y Maxwell, 2000).

Otro de los efectos del proceso de congelación y descongelación sobre la célula espermática, es la aceleración de la maduración de las membranas celulares, lo que lleva a un aumento en el número de espermatozoides capacitados y con reacción acrosómica (Watson, 1995; Maxwell y Watson, 1996; citado por Salamon y Maxwell, 2000). Según Ijaz y col. (1989), el efecto de una capacitación prematura estaría provocado por la yema de huevo, encontrándose también que el glicerol tendría un efecto similar (Slavik, 1987). Los cambios que sufre la membrana celular, no afectarían la motilidad espermática, afectando si en cambio la sobrevivencia del espermatozoide. Si la célula que presenta una capacitación temprana no encuentra un óvulo en un corto período de tiempo, no se producirá la fertilización, puesto que el espermatozoide sufrirá una muerte prematura en la parte posterior del tracto reproductivo de la hembra (Salamon y Maxwell, 2000).

Una estructura del espermatozoide que se ve afectada por el proceso de preservación es la mitocondria. El cervix de la oveja posee adecuados niveles de oxígeno para mantener la motilidad del espermatozoide, presentando en cambio bajos niveles de glucosa. Esto implica, que el espermatozoide de carnero dependa en gran medida de la respiración mitocondrial para obtener ATP, el cual es requerido para mantener la motilidad espermática en el cervix (Windsor, 1997). El daño mitocondrial, afectó la fertilidad en ovejas que fueron inseminadas con semen congelado por vía cervical, no influyendo sobre la fertilidad cuando las ovejas se inseminaron en forma intrauterina. Esto demuestra, que aquellos espermatozoides que presentan una mitocondria capaz de mantener su potencial de membrana, son capaces de preservar su motilidad en un medio viscoso. Se podría concluir que el daño estructural a la mitocondria durante la congelación, está implicado en la baja fertilidad del semen congelado en la inseminación por vía cervical (Windsor, 1997).

A pesar de obtenerse altas tasas (88-93%) de fertilización con semen congelado mediante inseminación intrauterina, el porcentaje de parición fue bajo (25% - 17/68), debido a una alta tasa de mortalidad embrionaria (Salamon y Lightfoot, 1967; citado por Salamon y Maxwell, 1995b). La mortalidad embrionaria se define generalmente como la muerte del ovocito fertilizado y embrión, ocurrida hasta el final de la etapa de implantación (Maxwell y Salamon, 1993). Es un factor adicional que influye en la baja fertilidad lograda con IA vía cervical con semen congelado, el cual se suma a las alteraciones en la estructura, en el transporte y en la viabilidad espermática (Salamon y Maxwell, 1995b). Según Vishwanath y Shannon (1997), el desarrollo del embrión se encuentra afectado por el estado de los gametos en el momento de la fecundación. Aún cuando la capacidad de penetración del espermatozoide se mantenga, se generan daños irreparables al núcleo y la

mitocondria de la célula espermática, lo que afecta la viabilidad del embrión concebido (Vishwanath y Shannon, 1997). Además de las alteraciones mencionadas, se ha asociado la viabilidad del embrión a un envejecimiento que podría sufrir el espermatozoide congelado - descongelado en el tracto reproductivo de la hembra. Ovejas inseminadas con espermatozoides congelados - descongelados (capacitados) dentro de los cuernos uterinos y en un momento cercano a la ovulación, son más factibles de producir embriones viables (Gillan y col., 1997; citado por Salamon y Maxwell, 2000).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo constó de dos fases, una de producción y evaluación de dosis de semen congelado y otra de inseminación artificial y evaluación *in vivo*.

5.1 FASE 1: PRODUCCIÓN DE DOSIS DE SEMEN CONGELADO

5.1.1 Colecta y evaluación de semen

Se utilizaron 7 carneros (2-4 años de edad) de la raza Merino Australiano, clínica y reproductivamente aptos. Los mismos permanecieron 2 meses previos al período de colecta en régimen de manejo semi intensivo, pastoreando durante el día sobre pasturas mejoradas y estabulados por la noche, donde se les proporcionó fardos de alfalfa y ración balanceada.

La colecta tuvo lugar en el establecimiento "Piedra Mora" (Ruta 26 Km 101, Latitud Sur 31°54'; Longitud Oeste 57°14') departamento de Paysandú. Los trabajos de laboratorio se llevaron a cabo en la Regional Noroeste del Laboratorio Regional "Miguel C. Rubino" (Ruta 3 Km 373; Paysandú, Uruguay)

Los carneros fueron sometidos a un régimen de colecta por medio de vagina artificial (según Duran del Campo, 1980), previo a la temporada de servicios del predio. Se obtuvo diariamente dos eyaculados consecutivos por cada carnero, con un intervalo de 10 minutos entre ambos, que tras hacer un pool con el objetivo de minimizar la variación entre eyaculados (Windsor, 1997b), se procesaron como un solo eyaculado. Para ser considerado, cada eyaculado en forma individual debió estar dentro de los rangos aceptables de: volumen (0.75-2ml), concentración ($\geq 2.5 \times 10^9$ espermatozoides/ml), y MS ($\geq 70\%$).

Luego de la colecta, los eyaculados de cada carnero se ubicaron en un baño de agua a 33°C para evaluar sus parámetros de MS y concentración espermática con un fotómetro (Spermacue®, Minitüb, Landshut, Germany). Con el objetivo de minimizar el efecto individual, luego de valorada la concentración se realizó un pool con los eyaculados de los distintos carneros (dosis heterospérmicas), considerando que cada carnero aportó igual número de espermatozoides al pool. Dicho pool permitió manipular con mayor seguridad las alícuotas para estudiar los diferentes tratamientos y protocolos de procesamiento del semen.

5.1.2 Extensores y procesamiento del semen

Se fraccionó el pool de semen en 10 alícuotas (tratamientos), cada una de ellas se diluyó paulatinamente hasta la concentración final de inseminación (200×10^6 espermatozoides/dosis) en los diferentes extensores definidos.

5.1.2.1 Extensores (diluyentes)

El mismo extensor tuvo dos preparaciones diferentes según fue utilizado en el protocolo de 1 (fracción única) o de 2 pasos (2 fracciones) de extensión, a saber:

1. Bioexcell (IMV, L'Aigle, France) 1 paso (6.4 % glicerol)
2. Bioexcell (IMV, L'Aigle, France) 2 pasos:

Fracción I igual a 1 paso sin glicerol
Fracción II igual a 1 paso con 12.8% glicerol



3. INRA- 96 (IMV, L'Aigle, France) 1 paso (5% yema + 4% glicerol)
4. INRA- 96(IMV, L'Aigle, France) 2 pasos:
Fracción I igual a 1 paso sin glicerol
Fracción II igual a 1 paso con 8% de glicerol
5. Leche descremada UHT 1 paso (5% yema + 2% fructosa + 7 % glicerol)
6. Leche descremada UHT 2 pasos: Fracción I igual a 1 paso sin glicerol
Fracción II igual a 1 paso con 14% glicerol
7. TRIS yema 1 paso (20% yema + 4% glicerol)
8. TRIS yema 2 pasos: Fracción I igual a 1 paso sin glicerol
Fracción II igual a 1 paso con 8% glicerol
9. Diluyente Rojo (IMV, L'Aigle, France) 1 paso (20% yema + 4% glicerol)
10. Diluyente Verde/Rojo (IMV, L'Aigle, France) 2 pasos:
Fracción I: Diluyente Verde (sin glicerol)
Fracción II: Diluyente Rojo (8% glicerol) suplementado con 4% glicerol.

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

5.1.2.2 Protocolos de procesamiento

Protocolo de 1 paso:

- a) dilución paulatina del semen a 30-33°C en el diluyente con glicerol hasta la concentración espermática final deseada de 200 millones de espermatozoides por dosis.
- b) envasado en pajuelas de 0.25 ml a temperatura ambiente
- c) sellado anaeróbico con alcohol polivinílico
- d) enfriado hasta 5°C y equilibración (simultáneamente) durante 2 horas
- e) congelación en vapores de nitrógeno y almacenamiento hasta su evaluación y/o utilización.

Protocolo de 2 pasos:

- a) dilución paulatina del semen a 30-33°C con la fracción I (del diluyente de 2 pasos), sin glicerol, hasta la concentración espermática de 400×10^6 de espermatozoides.
- b) descenso de temperatura hasta 5°C en un tiempo de 1.5 horas
- c) segundo paso de la dilución con el agregado de la fracción II, la cual contiene el doble de la concentración final de glicerol, hasta obtener la concentración final espermática deseada (200×10^6).
- d) envasado en pajuelas de 0.25 ml, a 5°C
- e) sellado anaeróbico con alcohol polivinílico
- f) equilibración a 5°C durante 2 horas

- g) congelación en vapores de nitrógeno y almacenamiento hasta su evaluación y/o utilización.

Este procedimiento se repitió hasta completar suficiente número de dosis (10 replicados o días de congelación) por protocolo como forma de minimizar el efecto "día de congelación".

5.1.3 Evaluación post descongelación

Luego de descongelar 3 pajuelas en baño de agua a 35-37°C por 30 segundos y hacer un pool de las 3, 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, se colocó el cubreobjetos de la cámara y se observó mediante microscopio óptico. Se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea uniforme de 4 campos ópticos asignando un valor (escala ordinal de 5 en 5, de 0 a 100). Para cada tratamiento (diluyente x protocolo) se realizó el promedio de la MS de los 10 replicados.

5.1.4 Análisis estadístico

Los datos promedios de los 10 replicados obtenidos en la fase 1 (producción de dosis y evaluación) se analizaron por test de *Chi-cuadrado*. Los datos se procesaron estadísticamente con el programa Intercooled Stata 6.0 (1999) y donde se encontraron diferencias se analizaron intra diluyente e intra protocolo de dilución.

5.2 FASE 2: INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Esta fase se llevó a cabo en el establecimiento ganadero anteriormente mencionado. Se inseminaron por vía cervical un total de 731 ovejas multíparas de la raza Merino Australiano en celo natural. Con el propósito de minimizar el efecto "día de trabajo" y de completar un número importante de servicios por protocolo, el ensayo se extendió por 7 días (del 4 al 11 de abril del 2005), procurando equilibrar el número de inseminaciones por tratamiento y por día.

La inseminación fue realizada por el mismo operario durante todo el período, colocando a las ovejas con el tren posterior elevado sobre la baranda del tubo en la posición de inseminación ("over the rail"). Se utilizaron cánulas y el dispositivo correspondiente de inseminar cervicalmente ovinos con pajuelas 0.25 (17300/0000, 17320/000, Minitüb, Alemania), ayudado por vaginoscopio con fuente de luz (Walmur®).

Durante todo el ensayo se llevaron registros de lluvias.

5.2.1 Detección de ovejas en celo

El régimen de detección fue de 1 vez por día. Para detectar las ovejas en celo natural se utilizaron capones androgenizados (ciclopropionato de testosterona 100 µg I/M /semana; Testosterona Ultra Lenta Fuerte®, Dispert, Uruguay) al 4% en la majada, pintados en el pecho con tierra de color. A estos efectos, se encerró la majada diariamente (18.30 h) en un potrero pequeño junto con los capones

androgenizados, los que fueron apartados en la mañana siguiente al separar las ovejas marcadas para luego ser inseminadas, permitiendo al resto de la majada pastorear durante el día en otro potrero más grande.

5.2.2 Inseminación con semen fresco (Control)

Diariamente y en forma previa a la inseminación con semen congelado, se inseminó un grupo de ovejas con semen fresco. Este grupo Control permitió conocer y evaluar la fertilidad potencial de la majada. Se utilizó el semen de los mismos 7 carneros procesado en igual forma que para la congelación (pool), a efectos de equiparar las características de las dosis de semen congelado (en volumen y concentración espermática). El pool de semen fue diluido paulatinamente con leche descremada UHT y mantenido a 35°C hasta su uso en inseminación (semen fresco diluido). Luego de realizada la dilución, el semen fue envasado en pajuelas de 0.25cc conteniendo 200×10^6 espermatozoides por dosis (a efectos de reproducir las condiciones de volumen y concentración espermática de las dosis congeladas respectivamente) y se inseminó el número de ovejas asignadas ese día para el protocolo Control (aproximadamente la misma cantidad que para cada uno de los tratamientos de semen congelado). El número total de ovejas que integraron el grupo control fue 100. También se evaluó la MS luego de envasado el semen y previo a las inseminaciones del grupo Control.

5.2.3 Inseminación con semen congelado (tratamientos)

Se utilizaron los tratamientos de semen que luego de evaluar la MS presentaron resultados superiores, y un tratamiento que presentó resultados bajos a efectos de observar su performance *in vivo*.

A saber:

1-INRA-96 (IMV, L'Aigle, France) 1 paso (5% yema + 4% glicerol) (3) *

2-INRA-96 (IMV, L'Aigle, France) 2 pasos: (4)

Fracción I: igual a 1 paso sin glicerol

Fracción II: igual a 1 paso con 8% de glicerol

3-Leche descremada UHT 1 paso (5% yema + 2% fructosa + 7 % glicerol) (5)

4-Leche descremada UHT 2 pasos: (6)

Fracción I: igual a 1 paso sin glicerol

Fracción II: igual a 1 paso pero con 14% glicerol

5- Diluyente Rojo (IMV, L'Aigle, France) 1 paso (20% yema + 4% glicerol) (9)

6- Diluyente Verde/Rojo (IMV, L'Aigle, France) 2 pasos: (10)

Fracción I: Diluyente Verde (sin glicerol)

Fracción II: Diluyente Rojo (8% glicerol) suplementado con 4% glicerol.

*Los números entre paréntesis corresponden a los números que se le habían asignado a cada tratamiento en la fase 1 "Producción de dosis de semen congelado" para su identificación.

Diariamente, una vez inseminadas las ovejas del grupo Control, se procedió a inseminar con el semen congelado procesado con los diferentes tratamientos a evaluar, para lo cual se debieron descongelar las pajuelas correspondientes en un baño a 35-37°C por 30 seg. Con el fin de controlar la variación por replicado y que el mismo afectara el mínimo posible los resultados, al momento de descongelar las diferentes dosis, se procuró tomar un número equilibrado de pajuelas de cada día de producción de dosis de semen congelado (fase 1). Este procedimiento se repitió hasta completar suficiente número de ovejas inseminadas por tratamiento. En cada oveja se registró el número de caravana, el protocolo de procesamiento y tratamiento del semen congelado utilizado, el estado corporal (según escala de 1 a 5, Rusell y col, 1969), el color del mucus cervical (T: transparente, B: blanco, Q: caseoso) y cantidad del mismo (1: nada, 2:poco, 3:mucho) y profundidad de penetración de la cánula de inseminación en el cervix (1: 0-1cm, 2: 1.1-2cm, 3: más de 2 cm. dentro del canal cervical), para luego ser relacionados con los resultados de fertilidad.

Posteriormente las ovejas fueron dejadas un breve período en descanso y llevadas luego a un potrero de ovejas inseminadas (registrando con pintura para lanares el día de inseminación correspondiente).

5.2.4 Evaluación de resultados

5.2.4.1 Tasa de No Retorno a los 21 días de servicio (TNR 21d)

Se controlaron las ovejas que retornaron al celo a partir de los 14 días del servicio, considerando como resultado favorable el no haber manifestado celo luego de 21 días post servicio. Además se calculó la magnitud absoluta de las pérdidas de fertilidad (diferencia porcentual absoluta entre el valor de no retorno al servicio y la fertilidad a la ecografía; NR-Eco).

5.2.4.2 Tasa de preñez

Luego de 30 días de inseminada la última oveja, se llevó a cabo el diagnóstico de gestación por medio de ecografía transrectal (Aloka 500, 5 MHz, Japón).

5.2.5 Análisis estadístico

Los resultados de fertilidad de la fase 2 (Inseminación artificial), se analizaron por medio de test de *Chi-cuadrado*. Los datos se procesaron estadísticamente con el programa Intercooled Stata 6.0 (1999).

6. RESULTADOS

6.1 FASE 1. Producción de dosis de semen congelado; colecta y evaluación

6.1.1 Motilidad espermática subjetiva

Los resultados para esta variable se presentan en cuadro N° 1.

Se observa que existió un efecto del diluyente y del protocolo de procesamiento del semen, sobre la Motilidad espermática subjetiva ($P < 0.05$). Se observó interacción entre estos efectos ($P < 0.05$) para el diluyente UHT.

TRAT	BIO 1p	BIO 2p	INRA 96 1p	INRA 96 2p	UHT 1p	UHT 2p	TRIS 1p	TRIS 2p	V/Rojo 1p	V/Rojo 2p
%MS	7,4	6,9	4,8	8,1	5,9	25,5	25,9	32,1	29,6	38

Cuadro N°1. Promedios de motilidad subjetiva expresada en porcentaje (%MS) de 10 replicados (congelaciones) para los 10 diluyentes estudiados *in Vitro*.

En el cuadro 2 se observan los promedios (de los 10 replicados) de motilidad subjetiva de los 6 tratamientos seleccionados para ser probados *in vivo*. Se observan diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos para este parámetro, siendo el tratamiento 10 (V/Rojo 2pasos) el que presentó mayor valor.

TRAT	INRA 96 1p	INRA 96 2p	UHT 1p	UHT 2p	V/Rojo 1p	V/Rojo 2p
%MS	4,8	8,1	5,9	25,5	29,6	38

Cuadro N°2. Promedios de motilidad subjetiva expresada en porcentaje (%MS) de los 6 tratamientos estudiados *in-vivo*.

6.2 FASE 2. Inseminación Artificial

Se inseminó un total de 100 ovejas en el grupo Control (semen fresco diluido y envasado en pajuelas), 102 con el tratamiento 3 (INRA 96 1 paso), 105 con el tratamiento 4 (INRA 96 2 pasos), 105 con el tratamiento 5 (UHT 1 paso), 103 con el tratamiento 6 (UHT 2 pasos), 107 con el tratamiento 9 (Verde/Rojo 1 paso), y 109 ovejas con el tratamiento 10 (Verde/Rojo 2 pasos).

6.2.1 Tasa de No Retorno a los 21 días de servicio

Como primer parámetro de evaluación del ensayo se registró la tasa de no retorno al celo a los 21 días de inseminadas las ovejas.

En el cuadro 3 se muestra el número de ovejas que no retornaron al celo entre los 14 y 21 días de haber sido inseminadas (Tasa de no retorno a 21 días). Estos valores son diferentes al número de ovejas preñadas (confirmadas por ecografía) para cada tratamiento.

Cuadro N°3. Tasa de No retorno a los 21 días comparado con el número de ovejas preñadas a la ecografía para cada tratamiento y magnitud de pérdidas de fertilidad.

Tratamientos	Control	INRA-96 1paso	INRA-96 2pasos	UHT 1paso	UHT 2pasos	Verde /Rojo 1paso	Verde/Rojo 2pasos
TNR 21d	57	10	11	20	18	25	26
Preñadas	67	3	1	8	13	19	16
NR-Fertilidad (%)	-15	70	91	60	28	24	38

TNR 21 d: Tasa de no retorno a los 21 días

NR-Fertilidad: Diferencia entre el número de ovejas que no retornaron al celo (NR) a los 21 días de inseminadas y el número de ovejas preñadas a la ecografía (fertilidad), expresado en porcentaje (%)

6.2.2 Resultados de tasa de preñez

Los resultados de fertilidad obtenidos mediante ecografía en el ensayo *In-vivo* se presentan en la figura 1. La fertilidad del grupo Control fue significativamente superior (67%) a la de todos los otros grupos de ovejas inseminadas con semen congelado (promedio de fertilidad general obtenido con semen congelado, 9%) ($P < 0.05$).

Entre los grupos de ovejas que fueron inseminadas con semen congelado, el tratamiento 9 (V/R 1-paso) presentó una fertilidad significativamente ($p < 0.05$) mayor que los tratamientos 3, 4, 5. También este tratamiento presentó mayores resultados de fertilidad que los tratamientos 6 y 10, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Los grupos inseminados con los tratamientos 5 (UHT 1-paso), 6 (UHT 2-pasos) y 10 (V/R 2-pasos), presentaron resultados con valores intermedios para este ensayo, no presentando diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). Los grupos de ovejas inseminados con los tratamientos 3 y 4 (INRA-96 1 y 2-pasos respectivamente) presentaron bajos resultados de fertilidad, difiriendo significativamente de los demás ($p < 0.05$).

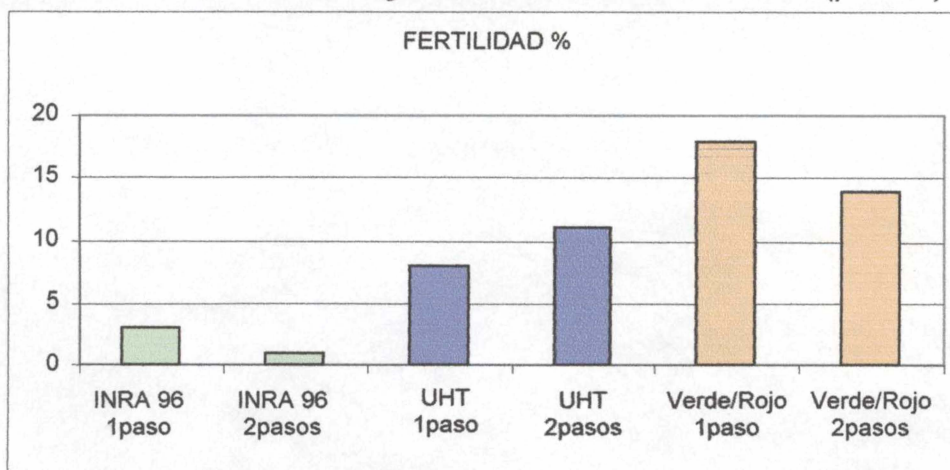


Figura N°1. Fertilidad expresada en porcentaje (%) de las ovejas inseminadas con los diferentes tratamientos de semen congelado.

No se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en los resultados de fertilidad intra tratamientos (diluyente), con respecto al protocolo de procesamiento (1 paso vs. 2 pasos).

6.2.3 Fertilidad día a día control vs. congelado

En la figura II se observa el porcentaje de fertilidad para el grupo control vs. tratamientos de semen congelado (promedio de todos los tratamientos), obtenido día a día del ensayo. Las líneas de tendencias (polinomial de tercer grado) del grupo control y la de los grupos inseminados con semen congelado muestran un patrón similar día a día (en el transcurso de los días).

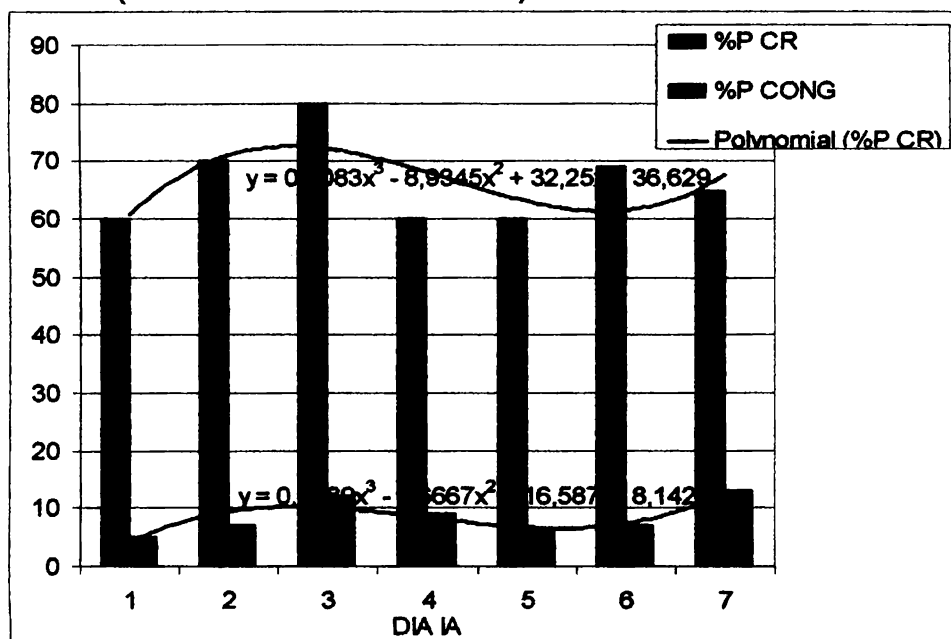


Figura N°II. Evolución de la fertilidad día a día. Resultados de porcentaje de preñez del grupo control (%P CR), comparados con resultados de porcentaje de preñez de los grupos inseminados con semen congelado (%P CONG).

6.2.4 Variables factor

6.2.4.1 Estado corporal

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los resultados de fertilidad con respecto al estado corporal (escala 1-5) de las ovejas.

6.2.4.2 Color de mucus cervical

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los resultados de fertilidad y el color de mucus cervical que presentaban las ovejas al momento de la IA.

6.2.4.3 Cantidad de mucus cervical

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los resultados de fertilidad y la cantidad de mucus cervical al momento de la IA.

6.2.4.4 Profundidad de IA

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los resultados de fertilidad con respecto a la profundidad de IA.

6.2.4.5 Lluvias

En este trabajo no se encontró influencia de la lluvia sobre la fertilidad, dado que al análisis estadístico no hubieron diferencias significativas ($p>0.05$) en los resultados de fertilidad con respecto a: presencia o ausencia de lluvias y cantidad en mm en cada día que se registraron precipitaciones (día 4 de IA: 40mm, día 7 de IA: 80mm).

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se procuró evaluar el efecto de diferentes diluyentes-extensores y protocolos para la congelación de semen de carnero. Esta respuesta fue observada tomando en cuenta dos variables, las cuales fueron la motilidad subjetiva al descongelado (*in-vitro*) y la fertilidad a la IA por vía cervical mediante el no-retorno a los 21 días post IA y el diagnóstico de gestación por ecografía 30 días luego de ser inseminada la última oveja.

Si bien la fertilidad es en definitiva la respuesta final a todo método de procesamiento de semen e inseminación, ésta se ve afectada por un gran número de factores que van más allá de la preservación y calidad seminal en sí, como ser factores ambientales, intrínsecos de la hembra, factores humanos, manejo, sanidad, etc. Algunos que podrían resaltarse son: las variables climáticas, la detección de celo, manipulación del semen preservado, pericia y experiencia del inseminador, momento de inseminación con relación al momento de la ovulación. Por esta razón, como variable de evaluación, la fertilidad puede tornarse poco práctica, costosa en tiempo y requerir un alto número de animales.

Debido a su sencillez, la evaluación de la motilidad subjetiva es una técnica que puede utilizarse en el laboratorio o en condiciones de campo (Duran del campo y col., 1993). Por otro lado la evaluación de motilidad subjetiva al descongelado, permite analizar en cierta medida el efecto de un diluyente sobre el semen previo a su uso *in-vivo*. El estudio de este parámetro expresa de manera subjetiva, el porcentaje de espermatozoides que presentan un movimiento rectilíneo, uniforme y progresivo, función que requiere mantener ciertas características estructurales y metabólicas que están asociados a la capacidad fecundante, tales como integridad de la cola, respiración mitocondrial, batería enzimática, aunque aun manteniendo la motilidad, el espermatozoide puede presentar una capacidad de fertilización disminuida o impedida irreversiblemente (Watson, 2000).

Esto no implica, que solamente la motilidad subjetiva sea suficiente para definir una postura sobre un semen diluido y preservado que esté siendo evaluado, sino que podría considerarse una herramienta muy útil y de bajo costo a la hora de la evaluación seminal que permitiría orientarnos sobre la calidad biológica de la dosis de IA. Por esa razón se utilizó la evaluación de este parámetro en este estudio para los 10 tratamientos de semen, permitiendo seleccionar según los resultados estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), 6 tratamientos con sus respectivos protocolos de procesamiento para ser evaluados *in-vivo*. Se seleccionaron 2 bases (UHT y Verde/Rojo®) que dieron resultados más altos de MS y una base (INRA-96®) que arrojó bajos resultados de MS al descongelado para comprobar si esto se correspondía con los resultados de fertilidad.

Uno de los puntos centrales de este ensayo fue la vía de IA, la cual fue la cervical, método que presenta ciertas limitantes con el semen congelado en los ovinos, no siendo muy alentadores sus resultados de fertilidad cuando se han utilizado en conjunto (Salamon y Maxwell, 1995a). Esta situación es diferente cuando el semen es depositado en forma intrauterina por vía laparoscópica o transcervical. Sin embargo, este método requiere de un equipo de alta especialización, elevados costos, más tiempo por oveja y mayor grado de adiestramiento que la IA por vía cervical (Campbell y col., 1996). Sumado a esto hay que agregarle el costo de la sincronización de grupos numerosos de ovejas para aumentar la eficiencia de la técnica y del laparoscopia. Es además, una técnica quirúrgica, a veces rechazada por los productores y por las nuevas normas de

“bienestar animal”, con países que ven un riesgo potencial por residuos con el uso de progestágenos clásicamente utilizados en la sincronización estral. Por lo tanto, la vía cervical es la que permitiría la masificación del uso del semen congelado, dado que es una técnica sencilla, de bajo costo, rápida y poco invasiva. El hecho de poder alcanzar resultados de fertilidad satisfactorios combinando la IA vía cervical con el semen congelado, podría convertirse en una herramienta de alto valor para el desarrollo y difusión de la mejora genética en los ovinos.

Con el objetivo que el efecto de cada carnero fuera minimizado, se realizó un pool de semen, al cual cada carnero aportó el mismo número de espermatozoides. El uso de dos eyaculados de cada carnero para cada replicado permitió minimizar la variación entre eyaculados de un mismo macho. Reconocemos esos factores como fuente de variación importante, pero analizarlos no fue el objetivo del presente trabajo. Esta metodología permitió además, manipular con mayor seguridad las alícuotas para estudiar los diferentes diluyentes de conservación (Windsor, 1997b).

Respecto al registro de la tasa de no retorno a los 21 días (TNR 21d), este es tomado como un parámetro temprano (previo a la ecografía) que orienta sobre el posible resultado del servicio recibido, no tiene costos y es sencillo de recabar su información. En este estudio se encontró una diferencia en los valores absolutos de las ovejas que no retornaron al celo, con los resultados de preñez confirmados por la ecografía, siendo los mismos menores, excepto para el grupo Control, lo cual podría estar explicado por un % relativo de ovejas que retornan al celo en la preñez temprana (García y Ugarte, 1998). En cuanto a las diferencias globales entre la TNR 21 d y la tasa de preñez, esto podría deberse a fallas en la detección de celos, al tomar los registros de retorno al celo, o a una mortalidad embrionaria temprana explicada en parte por la menor viabilidad de los embriones cuando se insemina con semen preservado (Salamon y Maxwell, 1995b). Además puede haber existido un efecto adverso del clima, dado por lluvias que alcanzaron los 80mm el séptimo día de inseminación, influyendo sobre la implantación y calidad embrionaria (Doney y Gunn, 1972).

En cuanto a la ecografía, esta es una técnica confiable, pero necesita de equipo y personal entrenado para realizarla, implicando esto mayor tiempo y un costo económico con respecto a la tasa de no retorno a los 21 días. Los resultados de fertilidad obtenidos mediante ecografía, en el grupo de ovejas inseminadas con semen preservado fueron inferiores (estadísticamente significativos, $p < 0.05$) para cualquiera de sus tratamientos (INRA-96®, UHT, Verde/Rojo® en 1y 2-pasos respectivamente) con respecto al grupo de ovejas inseminadas con el semen sin preservar (Control). Dentro de los tratamientos de semen preservado el diluyente Verde/Rojo® fue el que presentó mejores resultados de fertilidad ($p < 0.05$) con respecto a los demás en su protocolo de 1-paso, el cual es práctico, e implica menor tiempo de procesamiento (Salamon, 1976; Evans y Maxwell, 1987), sumado a que éste es un diluyente que se encuentra disponible comercialmente. Sin embargo, el diluyente UHT presentó mejores resultados de fertilidad en su protocolo de 2-pasos, aunque menores que el mencionado anteriormente ($p > 0.05$) sumado a que insume mayor tiempo y requiere de la preparación de 2 fracciones. Para las condiciones de éste ensayo parece que el protocolo que favorece los resultados, depende del diluyente utilizado.

Las diferencias encontradas entre el semen preservado y el fresco estarían determinadas por parámetros asociados a la calidad afectada irreversiblemente en el semen congelado y que disminuyen su fertilidad, como por ejemplo alteración de la motilidad, de la actividad mitocondrial, y otros factores mencionados anteriormente.

Se sabe que la preservación promueve efectos similares a la capacitación, y asumiendo que luego de ésta sobreviene el siguiente paso de reacción acrosómica y muerte en el corto plazo, estaría comprometida la "longevidad" de la población de espermatozoides depositados en el tracto reproductivo femenino. Otras alteraciones que se dan son en la interacción con las células epiteliales del oviducto, en el desarrollo embrionario con la consecuente muerte embrionaria (Salamon y Maxwell, 1995b).

Se deben tener en cuenta además factores que pueden haber afectado a las hembras disminuyendo su fertilidad, como ser el stress que padecieron con la manipulación durante la inseminación (apartes, traslados, sujeción, etc.), el clima al que se encontraron expuestas durante el periodo previo y post inseminación, aunque no se hayan encontrado diferencias significativas ($p > 0.05$) de fertilidad entre los días que se presentaron lluvias con respecto a los que no. Doney y Gunn, (1972) reportan un efecto del clima adverso sobre la tasa de ovulación, disminuyendo la misma y sobre la mortalidad embrionaria temprana, incrementándola. De acuerdo con esto y pese a que no se encontraron diferencias significativas estadísticamente, en este estudio parecería haber existido un efecto climático por día, que afectara de igual forma la fertilidad de ambos grupos de ovejas inseminadas (con semen preservado y grupo control) (ver figura N°IV).

Otro factor importante es la frecuencia en la detección de la hembra en celo, la cual se realizó una vez por día, asumiendo un esquema tradicional de manejo de lanares en nuestro país. Sumado a esto, el tamaño de la población sobre la cual se trabajó, tornaba muy complejo el realizar más de una detección de celo al día. Por otro lado hay autores que recomiendan doble detección diaria (a.m.-pm) (Gil y col, 2001) con el objetivo de lograr la deposición del semen lo más próximo posible al momento de la ovulación, pudiendo recomendarse esto al trabajar con semen congelado debido a la menor viabilidad del mismo, para optimizar las posibilidades de encuentro entre los gametos.

Uno de los parámetros asociado al momento del celo en que se encuentra la hembra, es el mucus cervical, tanto en su cantidad como en su color (Duran del Campo, 1993). Ambos evaluados y registrados en este estudio, no presentaron diferencias significativas en resultados de fertilidad ($p > 0.05$) según registros de color (transparente, blanco, caseoso) ni en cantidad (nada, poco, mucho), en contraposición a Duran del Campo, A (1993) y Blank O, (1998) que reportan mejores resultados de fertilidad con semen congelado cuando el moco es abundante y transparente (filante).

El estado corporal de las ovejas al momento de inseminación fue otro parámetro registrado y evaluado en este estudio, no presentándose diferencias significativas de fertilidad ($p > 0.05$) entre los diferentes grupos de ovejas con valores de estado corporal que oscilaron entre ≤ 3 , 3.25, 3.5, 3.75; $\Rightarrow 4$. Siendo que se hubiera esperado que las ovejas que presentaban valores más altos hubieran obtenido mayores resultados de fertilidad debido a la asociación de ésta con la nutrición.

Por último y no menos importante, la profundidad de inseminación también fue registrada, no observándose diferencias significativas en cuanto a la fertilidad ($p > 0.05$) de acuerdo a si la cánula de inseminación había penetrado 0-1 cm, 1.1-2 cm, o más de 2 cm (1, 2 y 3 respectivamente). En contraposición a lo reportado por Eppleston y col, (1994) quienes señalaron que la fertilidad aumenta entre 7 y 12% por cada centímetro de mayor profundidad a la que se deposita el semen.

En las condiciones presentes en este trabajo se podría deducir que existió cierta asociación entre los resultados de MS y fertilidad dado que los tratamientos de semen que presentaron resultados más altos en el *in-vitro* mantuvieron su performance *in-vivo*, mientras que los que obtuvieron los resultados más bajos en el *in-vitro*, repitieron tal situación en el *in-vivo*. Esto coincide con lo que afirman Eppleston y Maxwell (1995) que la MS y la concentración total son los parámetros que más se correlacionan con la fertilidad, a pesar de que hay autores que reportan que el *in-vitro* no siempre se corresponde con el *in-vivo* (Sánchez Partida y col, 1999)

Sin duda, queda mucho por estudiar en procura de mejorar resultados de inseminación cervical con semen congelado. Un campo de trabajo es el que tiene como objetivo lograr mejorar la calidad de la dosis de semen congelado, sobre la base del desarrollo de nuevos diluyentes o al mejoramiento de los ya existentes; a la evaluación de protocolos de procesamiento (método de dilución) y al agregado de aditivos al semen preservado. Un ejemplo de esto que ha aportado resultados prometedores es el agregado de plasma seminal al descongelado (Gillan y col, 1999), sin que se hayan repetido resultados aún. No menos fértil es el campo de estudio del desarrollo de las técnicas de IA, las cuales presentan el desafío de superar la barrera del cervix de la oveja, mediante la dilatación hormonal o mecánica (instrumental), que permita resultados similares a la IA intrauterina (por laparoscopia), pero por vía trans-cervical. Por otra parte en cuanto a la detección de celos, sería recomendable estudiar los beneficios de realizarla dos veces por día o la implementación de la sincronización de la ovulación, ambas con el fin de optimizar el encuentro entre los gametos.

8. CONCLUSIONES

- 1.** La motilidad subjetiva es un parámetro *in-vitro* de utilidad para predecir la calidad potencial de una dosis de semen.
- 2.** La preservación de semen de carnero disminuye los resultados de fertilidad con respecto a los obtenidos con semen fresco al utilizar la vía cervical.
- 3.** El protocolo de procesamiento (dilución en 1 o 2-pasos) favorece los resultados *in-vitro* e *in-vivo* dependiendo del diluyente utilizado.
- 4.** El diluyente Rojo® (IMV, L'Aigle, France) en su protocolo de 1-paso, es sencillo, está disponible comercialmente y permitió obtener los mayores resultados posibles dentro de la gama de diluyentes y protocolos aquí estudiados.
- 5.** En este estudio, la fertilidad no se vio afectada por: cantidad y color de mucus cervical, estado corporal, profundidad de IA, lluvias.
- 6.** La IA cervical es una técnica sencilla y de bajo costo, que permitiría la masificación del uso del semen congelado en ovinos, teniendo por el momento limitaciones en cuanto a resultados de fertilidad que deben ser analizados en cada contexto productivo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aires VA, Hinsch KD, Müller-Schloesser F, Bogner K, Müller-Schloesser S, Hinsch E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*; 60: 269-279.
2. Andersen K, Aamdal J. (1972). Artificial Insemination with frozen semen in sheep in Norway. *World review animal production*; 8:77-79.
3. Andersen Berg K. (1999). Artificial insemination in sheep in Norway. *Proceedings of the Centre for Reproductive Biology (CRB): Special symposium "Aspects of ovine reproduction"*. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden. CRB report; 8:35-44.
4. Azzarini M, Valledor F. (1988). Inseminación intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en cello natural. *Producción ovina SUL*; 1:1-8.
5. Blank O. (1998). Eficiencia de la inseminación artificial a distintos tiempos después de la detección de celo, en ovejas Corriedale de la región de Magallanes. 62 p. Tesis Médico Veterinario. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias, Santiago, Chile.
6. Bonadonna T. (1986). *Reproducción Animal e Inseminación Artificial*. 272 pp. Editorial Hemisferio Sur. Tomo 1.
7. Bousseau S, Brillard JP, 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.
8. Campbell JW, Harvey TG, Mc Donald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*; 45:1535-1544.
9. Castrillejo A, Rodríguez H. (1981). Fertilidad del semen de carnero suplementado con prostaglandina F2 alfa. III Jornadas de Ovinos. 1-6. Tacuarembó. Uruguay.
10. Cavestany D. (1994). *Procesamiento y congelación de semen de toro*. 23 pp. Publicación Santa Catalina.
11. Colas G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil*; 42:277-285.
12. Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*; 45:1535-1544.
13. Decuadro-Hansen G, Magistrini M, Batelier F. (2001). 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.
14. Doney JM, Gunn RG. (1972). The effect of weather at mating time on reproductive performance of ewes. *International Congress of Animal Reproduction & Artificial Insemination, Munich, Alemania*.

15. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. (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
16. Durán del Campo, A. (1980). Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Editorial Hemisferio Sur.
17. Duran del Campo A. (1993). Manual practico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Capitulo 3, Inseminación Artificial. 43-45pp. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay.
18. El-Hajj Ghaoui R, Thomson P, Leía T, Evans G, Maxwell W. (2007) a. Autologous ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod Domest Anim*; 42(5):541-549.
19. El-Hajj Ghaoui R, Gillan L, Thomson PC, Evans G, Maxwell WM. (2007) b. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl*; 28(1):109-122.
20. Eppleston J, Salamon S, Moore N, Evans G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and the relationship to the fertility of frozen thawed ram semen. *Anim Rep Sci*; 36:211-225.
21. Eppleston J, Maxwell WMC. (1995). Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology*; 43: 777-788.
22. Evans G, Maxwell WMC. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats 194 pp. Butterworths, Sydney.
23. Fahy GM. (1986). The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*; 23: 1-13.
24. 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. *Producción ovina SUL*; 11: 51-62.
25. Fernández Abella D, Bonilla Riera C, Irabuena O, Sterla S. (2004). Efecto del método de sincronización de celos y manejo del semen conservado sobre la fecundidad ovina. *Producción ovina SUL* 16:19-31.
26. Fiser PS, Fairfull RW. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*; 21:542-551.
27. Foote R. (1984). Buffers and Extenders. Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction; 62-73. Colombia.
28. García M, Ugarte H. (1998). Determinación de la presencia y caracterización del estro durante la preñez temprana en ovejas Corriedale. . Tesis Médico Veterinario. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias, Santiago, Chile.
29. Gil J. (2001). Fertility of frozen ram semen under field conditions. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Sweden.
30. Gil J, Söderquist L, Rodríguez-Martinez H. (2002). Influence of centrifugation or low extension rates pre freezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*; 57:1781-1792.

31. Gil J, Rodríguez-Irazoqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. (2003) a. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*; 59:1157-70.
32. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. (2003) b. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*; 59:1241-1255.
33. Gil J, Olivera J. (2005). Preservación (refrigeración y congelación) de semen ovino y su uso por vía cervical. XXXIII Jornadas de Buiatría; 55-67. Ed. Centro Médico Veterinario de Paysandú. Paysandú, Uruguay.
34. Gillan L, Mortimer ST, Maxwell WMC, Evans G, Gellatly ES, Mc Phie CA. (1999) a. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*; 11:123-126.
35. Gillan L, Skovgold K, Watson PF, Evans G, Maxwell WMC. (1999) b. Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. *Reprod Fertil Dev*; 11: 309-315.
36. Gillan L, Maxwell WMC, Evans G. (2004). Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod Fertil Dev*; 16: 447-454.
37. Graham. EF, Crabo BG, Pace MM. (1978). Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J Anim Sci*; 47(Suppl. 2):80-119.
38. Grotte O, Graffer T, Olesen I. (1992). Artificial insemination with frozen ram semen in Norway. Proceedings 12th International Congress of Animal Reproduction & Artificial Insemination, Stockholm, Sweden. 1557-1559.
39. Gustafsson B, Edquist S, Einarsson S. (1975). The fertility of deep frozen ram semen supplemented with PGF2 alfa. *Acta veterinaria escandinava* 16:468-470.
40. Hafez E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editorial Interamericana. 542pp. 3^a Edición en Español.
41. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*; 11: 73-88.
42. Hammerstedt RH. (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.
43. Holm P, Petersen BA, Callesen H. (2000). Cervical insemination of sheep in natural or synchronized heat with frozen-thawed semen by Danish sheep farmers. Proc Sat Symp Reproduction in Small Ruminants; pp 67. 14th International Congress of Animal Reproduction & Artificial Insemination, Sandnes, Norway.
44. Ijaz A, Hunter AG, Graham EF. (1989). Identification of the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk –TES semen extender. *J Dairy Sci*; 72: 2700-2706.
45. Lightfoot RJ, Salamon S. (1969). Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci*; 22:1547-1560.
46. Lillo A. (1984). Lambing rates after single inseminations of ewes with liquid or deep frozen semen. Proceedings 10th International Congress of Animal Reproduction & Artificial Insemination, Urbana-Champaign, USA. 3: 373-374.

47. Marco Jimenez F, Puchades S, Moce E, Viudes de Cartro MP, Vicente JS, Rodriguez M. (2004). Use of powdered egg yolk vs. fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. *Reprod Domest Anim*; 39(6):438-441.
48. Matsuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen thawed ram spermatozoa. *J Reprod Dev*; 52(5):675-83.
49. Maxwell WMC, Salamon S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev*; 5: 613-638.
50. Maxwell W, Stojanov T. (1996). Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of some Antioxidants. *Reprod Fertil Dev*; 8: 1013-1020.
51. Maxwell W, Watson P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42: 55-65.
52. Memon MA, Gustafsson BK, Gram. EF, Crabo BG. (1984). Effects of prostaglandin supplementation on frozen thawed ram spermatozoa. 10th International Congress of Animal Reproduction & Artificial Insemination, IL, USA.
53. 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.
54. 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. 317-324pp. Córdoba. Argentina.
55. Olafsson T. (1980). Insemination of sheep with frozen semen. Results obtained in a field trial in Norway. *Zuchthygiene*; 15:50-59.
56. Olesen I. (1993). Effect of cervical insemination with frozen semen on fertility and litter size of Norwegian sheep. *Livest Prod Sci*; 37:169-184.
57. O'Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans AC, Lonergan P. (2007). *Theriogenology*; 67(7):1262-1268.
58. Pace MM, Graham EF. (1974). Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*; 39: 1144-1149.
59. Paulenz H. (2004). Artificial insemination in sheep with liquid and frozen-thawed semen. Doctoral thesis. Norwegian School of Veterinary Science.
60. Rodríguez Martínez H. (1990). Aspectos de la preservación de semen de rumiantes y suinos. XVIII Jornadas Técnicas de Buiatría: E1-E7. Paysandú. Uruguay.
61. Salamon S. (1968). Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Aust J Biol Sci*; 21:355-360.
62. Salamon S. (1976). Artificial Insemination of Sheep. Publicity Press, 104 pp. Chippendale, N.S.W.
63. Salamon S, Maxwell WMC, Firth JH. (1979). Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Anim Rep Sci*; 2: 373-385.
64. Salamon S, Maxwell WMC. (1995) a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*; 37:185-249.
65. Salamon S, Maxwell WMC. (1995) b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*; 38:1-36.

66. Salamon S, Maxwell WMC. (2000). Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*; 62:77-111.
67. Salgado C. (2004). Producción Ovina: Situación Actual y Perspectivas. Seminario de Producción Ovina: Propuestas para el negocio ovino. 29 y 30 de julio. Paysandú. Uruguay. 7-13.
68. Sanchez Partida LG, Molinia FC, Eppleston J, Maxwell WMC. (1992). Fertility of ram spermatozoa pellet frozen in novel diluents. *Proc Aust Soc Reprod Biol*; 24:14 abstract.
69. Sánchez Partida LG, Setchell BP, Maxwell W. (1997). Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*; 9: 689:696.
70. Sanchez Partida LG, Stchell BP, Windsor DP, Eppleston J, Maxwell WMC. (1999). Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*; Vol 20 N°2: 280-288.
71. Sayre BL, Lewis GS. (1996). Cervical dilatation with exogenous oxytocin does not affect sperm movements into the oviducts in ewes. *Theriogenology*; 45:1523-1533.
72. Sayre BL, Lewis GS. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin treated ewes. *Theriogenology*; 48:267-275.
73. SCMAU-SUL-INIA-MGAP. Montossi F, De Barbieri I. (2007). Proyecto Merino Fino del Uruguay: Una visión con perspectiva histórica. *Boletín de divulgación N°090*; 17-37pp.
74. Slavik T. (1987). Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zone –free hamster eggs. *J Reprod Fertil*; 79: 99-103.
75. Smith RL, Berndtson WE, Unal MB, Pickett BW. (1978). Influence of Percent Egg Yolk during Cooling and Freezing on Survival of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci*; 62: 1297-1303.
76. Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodríguez-Martínez H. (1997). Assessment of membrane integrity after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws. *Theriogenology*; 48:1115-1125.
77. Söderquist L, Lundeheim N, Nilsson B. (1999). Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws. *Rep Dom Anim*; 34:61-66.
78. SUL (Secretariado Uruguayo de la Lana). Pagina web: <http://www.sul.org.uy>. Anuario Estadístico Lanero 26/02/06.
79. Thibier M, Guerin B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 233-251.
80. Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Snith JF. (1997). Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*; 48: 269-278.
81. Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Snith JF. (1998). Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci*; 51: 275-287.
82. Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LM, den Daas JH. (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with

- extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*; 54: 57-67.
83. 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.
 84. Watson PF, Martin IC. (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.
 85. Watson PF, Martin IC. (1976). Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*; 6: 559-564.
 86. Watson PF. (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.
 87. Watson PF. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Rep Sci*; 60:481-492.
 88. White IG. (1993). Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: a Review. *Reprod Fertil Dev*; 5: 639-658.
 89. Windsor DP. (1997) a. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Dev* 9: 279-284.
 90. Windsor DP. (1997) b. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination in Merino ewes. *Anim Rep Sci*; 47: 21-29.