



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

**EFFECTO DE LA REFRIGERACION DEL SEMEN
DE CARNERO DURANTE 24 HORAS SOBRE
EL TRANSPORTE ESPERMATICO**

por

Claudia Sofía BONILLA RIERA

T E S I S

2000

MONTEVIDEO

URUGUAY

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA**



**EFFECTO DE LA REFRIGERACIÓN DEL SEMEN DE CARNERO
DURANTE 24 HORAS SOBRE EL TRANSPORTE ESPERMÁTICO**

por

Claudia Sofía BONILLA RIERA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**DEPARTAMENTO DE
DOCUMENTACIÓN Y
BIBLIOTECA**

TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo
(Orientación Ganadero-Agrícola).

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2000**

Tesis aprobada por:

Director: Ing. Agr. DANIEL FERNÁNDEZ ABELLA

DR. JULIO IRIBOYEN

DR. FERNANDO NAN

Fecha: _____

Autor: _____

AGRADECIMIENTOS:

Al Sr. Luis A. Bonilla Corbo y Sra. Aída Riera de Bonilla.

Al Dr. Luis Ricardo Bonilla Riera.

A María Inés Fernández Riera.

Al Sr. Mario Rodas.

Especialmente a: Ing. Agr. Daniel Fernández Abella y Sr. Nelson Villegas.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACION	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS.....	IV
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
2. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	2
2.1 <u>TRANSPORTE ESPERMATICO</u>	2
2.1.1 <u>Generalidades</u>	2
2.1.2 <u>Historia natural del comportamiento de los espermatozoides en el tracto reproductivo de hembras mamíferas</u>	3
2.1.3 <u>Factores reguladores del transporte del espermatozoides en el tracto femenino</u>	3
2.1.4 <u>Transporte de espermatozoides peri-coital</u>	5
2.1.4.1 <u>Transporte a través del cérvix</u>	9
2.1.4.2 <u>Transporte del espermatozoides en el útero y en el itsmo oviductal</u>	11
2.1.5 <u>Comportamiento del espermatozoides cerca de la ovulación</u>	12
2.1.6 <u>Reservorio espermático</u>	13
2.1.7 <u>Destino del espermatozoides no fertilizante</u>	14
2.1.8 <u>Penetración de las secreciones del oocito <i>in vivo</i></u>	15
2.1.9 <u>Papel de las hormonas</u>	16
2.1.9.1 <u>Mejoras en la retención y transporte del espermatozoides</u>	17
2.2 <u>CONSERVACION DE SEMEN DE CARNERO</u>	19
2.2.1 <u>Generalidades</u>	19
2.2.2 <u>Diluyentes para almacenaje líquido</u>	20
2.2.2.1 <u>Leche como diluyente</u>	20
2.2.2.2 <u>Diluyentes lácteos comparados con diluyentes sintéticos</u>	21
2.2.2.3 <u>Otros diluyentes</u>	22
2.2.2.4 <u>Buffers orgánicos como componentes de diluyentes</u>	22
2.2.2.5 <u>Azúcares como componentes de diluyentes</u>	23
2.2.2.6 <u>Yema de huevo como componente de diluyentes</u>	23
2.2.3 <u>Fertilidad después del almacenamiento líquido</u>	24
2.2.4 <u>Factores que influyen en la fertilidad después del almacenamiento líquido</u>	25
2.2.5 <u>Viabilidad y capacidad fertilizante del espermatozoide</u>	25
2.2.6 <u>Conservación de semen a -79°C y 196°C</u>	26
2.2.6.1 <u>Diluyentes basados en citrato-azúcares</u>	26
2.2.6.2 <u>Diluyentes basados en la leche</u>	26
2.2.6.3 <u>Diluyentes basados en lactosa</u>	26

2.2.6.4 Diluyentes basados en sacarosa.....	27
2.2.6.5 Diluyentes basados en Tris.....	27
<u>2.2.7 Agentes protectivos en los diluyentes</u>	28
2.2.7.1 Glicerol.....	28
2.2.7.2 Otros agentes crioprotectores.....	30
<u>2.2.8 Enfriamiento a 2-5°C y equilibración</u>	30
<u>2.2.9 Tasa de enfriamiento bajo 0°C y método de congelación</u>	31
<u>2.2.10 Descongelación del semen</u>	31
<u>2.2.11 Daño al espermatozoide durante la congelación-descongelación</u>	32
<u>2.2.12 Métodos de inseminación artificial en ovejas</u>	33
<u>2.2.13 Rol de las hormonas para mejorar la fertilidad</u>	36
<u>2.2.14 Efectos del plasma seminal en el medio de dilución</u>	38
<u>2.2.15 Mortalidad embrionaria</u>	38
<u>2.2.16 Efecto del carnero y fotoperíodo sobre la congelabilidad del semen</u>	39
3. MATERIALES Y METODOS.....	40
3.1 UBICACIÓN.....	40
3.2 ANIMALES.....	40
3.3 DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS.....	40
3.3.1 Ensayo I.....	40
3.3.2 Ensayo II.....	42
3.4 MANEJO DEL SEMEN.....	43
3.5 MANIPULACION DEL TRACTO GENITAL.....	43
3.6 DESCRIPCION DEL FLUSHING.....	44
3.7 RECUENTO DE ESPERMATOZOIDES.....	44
3.8 ESTADISTICA.....	44
<u>4. RESULTADOS Y DISCUSION</u>	45
4.1 RESULTADOS-ENSAYO I.....	45
4.2 RESULTADOS-ENSAYO II.....	47
4.3 DISCUSION.....	48
<u>5. CONCLUSIONES</u>	51
<u>6. RESUMEN</u>	52
<u>7. SUMMARAY</u>	53
<u>8. BIBLIOGRAFIA</u>	54
<u>9. ANEXO</u>	57

LISTA DE CUADROS

CUADRO I. Tratamientos realizados en el Ensayo I.....	41
CUADRO II. Tratamientos realizados en el Ensayo II.....	42
CUADRO III. Valores promedio de espermatozoides recuperados para los distintos tratamientos y porciones del tracto reproductivo femenino (Ensayo I).....	46
CUADRO IV. Estructuras ováricas (Ensayo I).....	46
CUADRO V. Valores promedio de espermatozoides recuperados para los distintos tratamientos y porciones del tracto reproductivo femenino (Ensayo II).....	47
CUADRO VI. Estructuras ováricas (Ensayo II).....	47

I. INTRODUCCION:

En Uruguay la economía está basada en la producción agropecuaria, siendo un país que se destaca en la producción de carne y lana. Ambos rubros son los que dinamizan el sector económico en la medida en que generan empleo y divisas.

La producción ovina contribuye con el 25 % de las exportaciones (Cardellino *et al.*, 1994); sus resultados productivos se basan fundamentalmente en el mejoramiento genético, la nutrición, un correcto nivel sanitario y un adecuado manejo reproductivo.

En nuestro país la inseminación artificial en ovinos ha encontrado un campo propicio para su desarrollo. El gran número de animales existente en un pequeño país, así como los grandes cambios en la producción ovina ocurridos en la pre y postguerra, fueron entre otros, los factores más importantes que condujeron a su utilización (Durán del Campo, 1964).

El uso de semen fresco conservado por más de 24 horas permite su traslado a distancias regionales, evitándose el uso de semen congelado, lo que implica menores costos y necesidades de conservación. Esto permitiría su utilización por un mayor número de productores, facilitando el traslado de semen en la región y evitando el transporte de animales.

La barrera del cuello uterino y transporte espermático del semen conservado son limitantes que impiden obtener buenos resultados de fertilidad, no obstante son superiores al compararlos cuando se insemina con semen congelado (Drobnis y Overstreet, 1992).

El plasma seminal de los mamíferos contiene espasmogénicos (prostaglandinas y sustancias) que estimulan la contracción del músculo liso cuando son introducidas al tracto reproductivo *in vitro*, no obstante su papel funcional sobre el transporte espermático no ha sido demostrado experimentalmente (Drobnis y Overstreet, 1992).

El principal objetivo de este trabajo es el estudio del transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra ovina y su importancia como causa de ineficiencia reproductiva, utilizando semen conservado a 4-5 °C durante 24 horas con o sin el agregado de PgF₂α. Asimismo, se evalúa el efecto del momento de inseminación dentro del estro (46 vs. 50 horas de retiradas las esponjas de sincronización) sobre el transporte espermático.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA:

2.1- TRANSPORTE ESPERMATICO:

2.1.1- Generalidades:

Luego de la deposición del eyaculado, los espermatozoides insumen cantidades de tiempo variables en el recorrido de las distintas porciones del tracto femenino, las cuales difieren considerablemente en sus secreciones, superficies epiteliales y actividad muscular.

Las células espermáticas migran activamente y también son movilizadas mecánicamente a lo largo del tracto femenino en el curso del transporte del semen. El mismo se acumula y puede ser retenido en regiones especializadas del tracto, más notablemente en el cérvix de algunas especies y en la porción del oviducto adyacente al útero llamado itsmo. Durante el período periovulatorio algunos espermias finalmente escapan y/o son liberados desde el itsmo para alcanzar el ámpula, fin del oviducto, donde ocurre la fertilización. La interacción del espermia fertilizador y las capas del oocito que intervienen es comúnmente considerada el inicio de la fertilización, la que culmina en singamia entre pronúcleos del macho y de la hembra. Durante su residencia en el tracto reproductivo femenino, el espermia de los mamíferos atraviesa importantes cambios celulares, alguno de los cuales son requeridos para la fertilización (Drobnis y Overstreet, 1992).

El transporte del espermia es muy complicado y envuelve numerosos tipos de células y tejidos, así como el sistema endocrino y nervioso del animal. Además el transporte del espermia es alterado significativamente por el momento del coito, que está condicionado por la ovulación.

El tracto reproductivo femenino, bajo control neural y endocrino, ocupa indudablemente el rol más importante en el transporte del espermia hasta el lugar de la fertilización.

La anatomía y fisiología del cérvix juega papeles instrumentales en el transporte del espermia en las distintas especies de mamíferos. El tracto femenino es seguramente el más importante componente en el proceso del transporte del espermia, y la complejidad de la fisiología involucrada, así como la variabilidad a lo largo de las especies puede solo ser imaginada (Drobnis y Overstreet, 1992).

La fertilización fallida, mayormente ocurrida por la ausencia del esperma en los oviductos, es una causa mayor de ineficiencia reproductiva en animales domésticos (Hawk, 1983).

2.1.2- Historia natural del comportamiento de los espermatozoides en el tracto reproductivo de hembras mamíferas:

Bedford (1983), propuso que la heterogeneidad de la fisiología del esperma *in vivo* es necesaria para asegurar que el esperma fértil vaya a estar presente por un período extenso de tiempo, porque el coito y la ovulación no son sincronizados en mamíferos.

Propiedades de la superficie como carga, adhesividad o expresión de moléculas específicas han sido también sugeridas como atributos que podrían afectar el transporte del esperma y la interacción gamética (Saack 1982; citado por Drobnis y Overstreet, 1992), por ejemplo si la motilidad del esperma en una muestra de semen de motilidad normal, que tiene los acrosomas intactos, tiene una superficie con carga anormal el semen podría tener una pobre fertilidad *in vivo*. La identificación de éste requisito de características fisiológicas del esperma y el nivel al cual ello afecta al transporte, nos permitiría identificar la(s) subpoblación (es) de esperma que tenga todas las características para el normal funcionamiento *in vivo*.

El esperma de primates y rumiantes debe atravesar con dificultad un relativamente largo canal cervical, emigrando a través del mucus para entrar al útero. En esas especies las secreciones cervicales tienen como función prevenir la invasión de microorganismos hacia zonas superiores del tracto reproductivo, previniendo el acceso de mucho esperma al útero (Drobnis y Overstreet, 1992).

2.1.3- Factores reguladores del transporte del esperma en el tracto femenino:

Un número de células, tejidos y sistemas de órganos juegan un activo papel en la determinación de la historia natural de las células espermáticas en el tracto femenino. Esos factores incluyen el comportamiento sexual en periodo de apareamiento, el plasma seminal, el espermatozoide, el tracto reproductivo femenino (músculatura, secreciones, superficie de células epiteliales), los productos de la ovulación (oocito, capas intervinientes en la fertilización, fluido folicular), y elementos inmunocompetentes del tracto femenino. Estos factores interactúan para establecer la distribución del esperma no más allá del tracto reproductivo, y probablemente controlan la fisiología de la población heterogénea de espermatozoides para asegurar el éxito de la fertilización. Estos factores primarios son ajustados por el sistema endocrino y nervioso, los cuales en turno son responsables de las condiciones del animal (Drobnis y Overstreet, 1992).

El comportamiento sexual del macho y de la hembra es sabido que influncia el transporte del esperma, y puede también afectar la fertilización y el desarrollo del embrión en sus primeras etapas (Parker, 1984; citado por Drobnis y Overstreet, 1992).

La estimulación de la hembra, el comportamiento copulatorio, y la ubicación del semen son factores que incrementan las chances de paternidad para el macho mejorando el transporte del esperma.

Ha sido demostrado en muchas especies que el plasma seminal (medio de suspensión del esperma eyaculado) puede influenciar el transporte seminal (Overstreet, 1983; Clavert *et al.*, 1985; Miller y Ax, 1988, citados por Drobnis y Overstreet, 1992). En el momento de la eyaculación no se deposita como una suspensión homogénea, hay muchas fracciones que varían en su composición y en su concentración espermática. La composición del plasma seminal varía según la especie (Mann, 1964; citado por Drobnis y Overstreet, 1992).

El plasma seminal contiene hormonas, enzimas y metabolitos y la función de esas sustancias bioactivas no es conocida. Se sospecha que algunos de éstos constituyentes seminales podrían mejorar el estatus del transporte del esperma a través de acciones en el mismo y/o en el tracto femenino.

Paradójicamente en algunas especies (por ejemplo caprinos) el plasma contiene sustancias que son tóxicas para el esperma (White, 1954; Shannon, 1965; Fossum *et al.*, 1965; Mayol y Longenecker, 1975; Roger *et al.*, 1983 citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

La dilución y/o modificación por fluidos del tracto femenino, o transporte diferencial del esperma y del plasma a lo largo del tracto, separa el esperma del plasma seminal. El esperma se recubre con las proteínas del plasma seminal en el momento de la eyaculación y ésta sería la más importante acción del plasma sobre las células del esperma. Las proteínas del plasma son factores capacitantes, lo cual ha sido descrito en la mayoría de las especies (Olipant *et al.*, 1985; Fraser, 1990; citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

Contracciones de la musculatura lisa coordinadas son capaces de empujar al esperma, o a partículas inmóviles a lo largo del tracto. Las secreciones mucosas del tracto femenino afectan el transporte del esperma de muchas maneras. Su arreglo anatómico a veces forma criptas y glándulas que actuarían como depósito del esperma. Las propiedades adhesivas del epitelio podrían retardar el pasaje del esperma, y las propiedades físicas y bioquímicas de las secreciones regularían la actividad flagelar del mismo. Finalmente las células inmunocompetentes del tracto femenino remueven activamente gran parte del esperma, lo que implica impedir su transporte.

Desde la iniciación del transporte del esperma hay una gran reducción gradual en número de espermias a lo largo del tracto, y muy pocos encuentran los oviductos. En término de una hora desde el apareamiento, una gran reducción en el número total de espermias ocurre en cerdas, ovejas, y vacas, así como más del 80 % del esperma eyaculado es expedito vía vaginal en dicho lapso.

Las acciones restrictivas del tracto reproductivo femenino durante el transporte espermático reducen el riesgo de fertilización poliespermática del oocito (Bedford, 1983), lo que es letal en mamíferos.

Cada uno de los productos de la ovulación (fluidos foliculares y capas de fluidos del oocito) ha sido propuestos como reguladores de la fisiología del esperma, relacionados a las fases finales del transporte espermático e interacción gametal en la ampolla. Un estudio ha puesto en evidencia que oocitos de mamíferos podrían activamente atraer al esperma fertilizante *in vitro* (Ralt *et al*, 1991), pero es desconocido si eventos similares ocurren *in vivo* (Drobnis y Overstreet, 1992).

Ha sido demostrado que el plasma seminal de varios mamíferos contiene prostaglandinas y otras sustancias que estimulan la contracción del músculo liso cuando son introducidas al tracto reproductivo *in vitro* (Freund, 1973; citado por Drobnis y Overstreet, 1992). Esto evidencia indirectamente que esos espasmogénicos pueden mejorar el transporte del esperma por el tracto femenino, pero éste papel funcional no ha sido demostrado experimentalmente.

El transporte del esperma ha sido mejorado mediante adición al semen o administración a hembras de algunos componentes como prostaglandina F_{2α}, oxitocina, estradiol, fenilefrina, y ergonovina (Hawk, 1983).

Los constituyentes seminales pueden actuar indirectamente estimulando las contracciones del tracto femenino (Drobnis y Overstreet, 1992).

2.1.4.- Transporte de esperma peri-coital:

El proceso del coito estimula las contracciones coordinadas de las capas de músculo liso del tracto femenino, afectando directamente el transporte del esperma.

Una gran cantidad de mucus se extiende desde el exocérvix, formando un depósito en el piso de la vagina, y el esperma puede continuar entrando al cérvix desde éste, luego del acto sexual.

Aunque el número de espermias adecuado para la fertilización alcance el cérvix en un tiempo entorno a los cinco minutos luego de la cópula, la persistencia del esperma

vaginal, servirá como salvaguarda si condiciones subóptimas del tracto reducen la probabilidad de fertilización.

En unos pocos minutos entorno al coito un pequeño número de espermias es transportado a lo largo del tracto femenino hacia el ámpula oviductal y dentro de la cavidad peritoneal; la ocurrencia de éste proceso llamado *transporte rápido* del espermia es controvertida, y ha sido descrito en diversas especies incluyendo bovinos (VanDemark y Moeller, 1950-1951), y ovinos (Phillips y Andrews, 1937; Schott y Phillips, 1941; Mattner y Braden, 1963; Quinlivan y Robinson, 1969). El transporte rápido es considerado por muchos como una característica prominente universal de los mamíferos (Drobnis y Overstreet, 1992).

La función del espermia de transporte rápido puede ser de un epi-fenómeno de las fuertes contracciones del tracto femenino al coito, lo que vierte espermia dentro del exocervix y a lo largo del cuerno uterino. Ha sido propuesto que éste espermia actúe como mensajero local hacia la parte superior del tracto reproductivo, quizás influenciando las fases subsecuentes o manteniendo el transporte del espermia (Overstreet, 1983). Alternativamente, ese espermia podría sensibilizar el sistema fagocítico en la cavidad peritoneal, la cual eventualmente removerá el exceso de espermia a continuación de la fertilización (Hunter *et al.*, 1980).

En ovejas el transporte rápido es asociado además con el oviducto y ovario más craneal (Mattner, 1963; Lightfoot y Restall, 1971). Por ligamiento unilateral del final del oviducto el espermia de transporte rápido fue retenido en ese lugar, mientras que, el espermia obviamente en el oviducto contra-lateral desapareció antes de la ovulación (Drobnis y Overstreet, 1992).

Muchos investigadores han encontrado poca o ninguna evidencia de una fase rápida de transporte de espermia en ovejas. En numerosos estudios, poco espermia fue recuperado de oviductos de ovejas a 30 minutos o a 1 hora o 2 horas después de una cópula o inseminación artificial, y nada de espermia fue recuperado de los oviductos de una alta proporción de ovejas. En alguno o en todos de esos estudios, es posible que espermia haya sido transportado rápidamente al ámpula después de la cópula o I.A. y haya sido removido dentro de la cavidad peritoneal en el momento de necropsia. Quizás más probablemente, una fase rápida del transporte de espermia en ovejas a veces puede ser omitida o suprimida (Hawk, 1983).

El estrés en la oveja suprime el transporte rápido del espermia a los oviductos. Mattner, citado por Hawk (1983), encontró que cuando las ovejas fueron molestadas deliberadamente el espermia no estuvo en los oviductos a los 15 minutos. Aunque que el estrés afecte el transporte del espermia a través de las contracciones uterinas sea cuestionable, Lehrer *et al.*, citados por Hawk (1983), encontraron que el miedo no suprime la motilidad uterina en ovejas.

Ligamiento y escisión de los oviductos momentos después de la cópula han sugerido que al menos 6-8 hs. son requeridas para que una población de espermatozoides se establezca en los oviductos de ovejas y bovinos, mientras que 15 minutos.-2 horas se requieren en cerdos (Hunter y Holl, 1974; Hunter, 1981).

La inseminación artificial también estimula las contracciones uterinas (VanDemark y Hays, 1952) y resulta en el transporte rápido del espermatozoide en bovinos (VanDemark y Moeller, 1951) y ovinos (Schott y Phillips, 1941; Mattner y Braden, 1963). Claramente, el coito no es un requisito absoluto para la ocurrencia del transporte rápido (Drobnis y Overstreet, 1992).

La similitud en estimulación de contracciones uterinas mediante cópula o inyecciones de oxitocina en bovinos (VanDemark y Hays, 1951, 1952), la correspondencia temporal de las contracciones uterinas y el peristaltismo (Hays y VanDemark, 1953) han sido consideradas claras evidencias indirectas por reflejar la liberación de oxitocina en el coito (Salisbury *et al*, 1978) (citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

La liberación de oxitocina ha sido medida durante manipulación mecánica del tracto reproductivo de bovinos y ovinos (Roberts y Share, 1969; Flint *et al*, 1975; Schams *et al*, 1982), pero no ha sido posible mostrar este reflejo después de la copulación (Schams *et al*, 1982; Garcia-Villar *et al*, 1985; Gilbert *et al*, 1991; citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

La dirección de propagación de contracciones uterinas fue evaluada por Toutain *et al* (1985), en cuatro ovejas usando técnicas electromiográficas durante 15 períodos de estro; 120, 101 propagaciones fueron analizadas. En hipótesis, la alta prevalencia de propagaciones descendentes son importantes para reducir la población de células espermatozoides mediante la selección del espermatozoide más vigoroso; tal selección es posible cuando la actividad cervical mecánica es alta (cérvis cerrado), se sugiere que tanto propagaciones ascendentes como descendentes participan en el transporte del espermatozoide mediante movimientos de ida y vuelta del fluido luminal hacia el lumen uterino.

Mediante inspección visual directa de úteros exteriorizados de ovejas anestesiadas por períodos de 10 minutos hay una impresión general de que las contracciones ascendentes son más numerosas que las descendentes en el comienzo del estro, mientras que las descendentes son más frecuentes durante el estro tardío (Toutain *et al*, 1985).

En rumiantes, el espermatozoide es depositado en la vagina, y sólo la actividad de las colas flageladas determina los movimientos de los espermatozoides a través del

cérvix. Una vez en el útero, el destino del espermatozoide dependerá de la dirección de la propagación uterina y de la ocurrencia de baja o alta actividad cervical (Toutain *et al*, 1985).

La alta prevalencia de propagación descendiente durante el estro sugiere que uno de los principales roles de la motilidad uterina, es el arrastre espermático desde el útero dentro del cérvix y vagina. Tal hipótesis es soportada por el hecho de que después de la inseminación intra-uterina, grandes números de espermatozoides móviles e inmóviles entran y atraviesan al cérvix en la dirección caudal y del total de espermatozoides recuperados del tracto, equivalente al 80 %, pasaron caudalmente a la vagina. Además, durante ese transporte de vuelta, las células móviles fueron más efectivamente retenidas cerca del lumen del cérvix permitiendo una nueva posibilidad para ese espermatozoide de retornar activamente al útero.

Tal hipotético movimiento de ida y vuelta de las células espermáticas entre el útero y el cérvix podría ser importante para reducir el número de los mismos mediante selección progresiva del más vigoroso y por eliminación definitiva de células inmóviles, incluyendo aquellos que han sido dañados dentro del útero (Toutain *et al*, 1985).

Un movimiento para atrás y para adelante del fluido luminal hacia el útero puede ser responsable del actual transporte del espermatozoide trans-uterino. En ese respecto las propagaciones recíprocas (descendientes en un cuerno e inmediatamente ascendientes en el otro), las cuales son los más frecuentes patrones de propagación al final del estro, parecen bien designadas para estimular el transporte rápido del espermatozoide hacia el oviducto cerca de la ovulación. Si las hipótesis son correctas, ésta capacidad de selección de espermatozoides necesita una cópula durante la primer mitad del estro, cuando la mayoría de las contracciones uterinas ocurren durante actividad regular (cérvix abierto) y son principalmente ascendentes. Cuando la cópula es realizada en ese momento, la tasa de concepción es alta. En contraste durante la segunda mitad del estro, el nivel de motilidad uterina decrece, especialmente su componente irregular. Consecuentemente, en ese momento, la motilidad uterina puede solo impulsar a un transporte no selectivo. En éste respecto puede ser asumido que cuando la ovulación es inminente, un relativamente rápido transporte del espermatozoide se vuelve una prioridad sobre la selección del mismo, desde que el tiempo de sobrevivencia del ovocito después de la ovulación es corto (<20 horas). Cuando la cópula es realizada alrededor de la ovulación la tasa de concepción es baja, quizás por ausencia de selección del espermatozoide y/o un tiempo de residencia suficiente en el útero y cérvix para capacitación.

En conclusión se sugiere que la capacidad de selección del espermatozoide es quizás uno de los mayores roles de la motilidad útero-cervical durante el estro (Toutain *et al*, 1983).

2.1.4.1- Transporte a través del cérvix:

Durante varias horas la redistribución del espermatozoides continúa, el número de espermatozoides es distinto a medida que cambian las regiones del tracto. Eventualmente, se alcanza un estado en que quedan listos los espermatozoides y la distribución de los mismos se mantiene relativamente estable hasta el período periovulatorio.

Estudios de ligamientos en conejos, cerdos y rumiantes han demostrado que una población de espermatozoides que es capaz de asegurar fertilización, está establecida en el oviducto más bajo durante las primeras horas después del coito. Continuando el transporte rápido, ningún espermatozoides entra al ampolla del oviducto hasta el período periovulatorio. De ésta manera los mismos están retenidos en el tracto oviductal y en el tracto más bajo (Drobnis y Overstreet, 1992).

La significancia de la restricción del espermatozoides desde el tracto reproductivo superior puede ser dividida en dos. Primero la sincronización del espermatozoides y transporte del oocito será altamente eficiente maximizando la fertilidad. Segundo, la limitante de la migración del espermatozoides hacia la cavidad peritoneal podría reducir el riesgo de ser asediado por células inmunocompetentes y formación de anticuerpos antispermatozoides por la hembra (Overstreet y Mahi-Brown, 1991; citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

Como algunos espermatozoides muertos entran en el mucus cervical después de ser depositados en la vagina de la oveja (Mattner y Braden, 1969; Lighthfoot y Restall, 1971; citados por Drobnis y Overstreet, 1992) parecería ser improbable que la motilidad del espermatozoides sea un absoluto requisito para la penetración en el mucus durante la fase peri-coital del transporte. Sin embargo, subsecuentemente la motilidad es vista como esencial para la entrada del espermatozoides en el mucus cervical, y espermatozoides inmóviles son probablemente descargados desde el cérvix mediante la continua secreción de mucus.

En humanos y rumiantes propiedades físicas del mucus cervical son controladas mediante esteroides circulantes (Odeblad, 1968; Litt *et al*, 1977), y el mucus es penetrable solamente por espermatozoides durante el período periovulatorio. El estrógeno estimula el incremento de la producción de mucus y una mayor hidratación de la gelimucinas, mientras la progesterona tiene efectos opuestos.

In vivo, el espermatozoides puede ser orientado a lo largo de senderos de mucus de menor resistencia durante el pasaje al epitelio cervical y/o lumen uterino (Mattner, 1966; citado por Drobnis y Overstreet, 1992).

Durante el período post-coital el número de espermatozoides inicial es más alto en el exocervix de la oveja (Hawk, 1983) y hay muy poco espermatozoides presente en el útero (Mattner, 1963). Mientras el espermatozoides continúa migrando hacia el útero un gradiente se

desarrolla a lo largo del cérvix, y por dos horas después de la cópula una significativa población ha entrado al útero (Hawk, 1983).

El gradiente en número de espermatozoides a lo largo del cérvix es mantenido en la mayor parte de la duración del transporte del espermatozoide en la oveja, con la mayor población mantenida en el exocervix, hasta 8 horas después de copular (Hawk, 1983). A lo largo del tiempo el número de espermatozoides gradualmente se incrementa en el mesocervix y endocervix así como en el útero, pero la población cervical total es mayor enseguida de la cópula (Mattner, 1963; Hawk, 1983). El número de espermatozoides en endocervix se mantiene bajo durante las 24 h. siguientes a la cópula (pocos millones), mientras se incrementan en los segmentos del tracto superior decrecen en el exocervix.

Estudios histológicos tempranos indicaron que el espermatozoide cervical no está regularmente distribuido entre el lumen y el epitelio (Mattner, 1968). La mayoría del espermatozoide se encuentra asociado con las superficies mucosas. Cuando espermatozoide inmóvil de ovinos fue inseminado en lugar de espermatozoide móvil, se mantuvo en el lumen, sugiriendo que el espermatozoide móvil migra activamente hacia la mucosa (Mattner, 1966; Lightfoot y Restall, 1971).

Mullins y Saacke (1989); citados por Drobnis y Overstreet, (1992), propusieron que el espermatozoide reostático continúa estando presente a lo largo del cérvix mediante migración en contra del movimiento mucoso.

Muchos estudios histológicos no pueden distinguir espermatozoide móvil de inmóvil, pero la orientación del espermatozoide hacia la superficie mucosa al menos sugiere que ese espermatozoide fue móvil (Drobnis y Overstreet, 1992).

Alternativamente, la mayoría de los espermatozoides ocurren como una agregación aislada que yace en o cerca de las fosas o criptas no profundas del cérvix. El vasto número de espermatozoides en esas agregaciones y la falta de alguna orientación común sugiere que alguna forma de estímulo externo, como contracciones cervicales, pueden ser responsables del movimiento en masa inicial y distribución del espermatozoide en el cérvix de la oveja. (Wergin, 1985).

La cópula en sí misma no incrementó la oxitocina o cortisol circulantes; la motilidad uterina se mantuvo incambiada durante y después de la cópula pero el cérvix fue significativamente estimulado durante el apareamiento y después de la cópula. Se sugiere que el incremento de la actividad cervical resultante de mecanismos adrenérgicos podría facilitar la generación de una reserva cervical de espermatozoides (García Villar *et al*, 1985).

Los problemas del transporte del espermatozoide generalmente son asociados con inmovilización y muerte del espermatozoide en el útero y segmentos anteriores del cérvix en un

entorno de 2 horas después de la cópula (Hawk, 1983).

El cérvix parece ser el sitio inicial de inhibición del transporte del esperma en ovejas. La causa en la inhibición del transporte del esperma no es definitivamente conocida, aunque posibles causas han sido consideradas (Hawk, 1983).

2.1.4.2- Transporte del esperma en el útero y en el itsmo oviductal:

Oleadas de las contracciones uterinas a lo largo del cuerno uterino, las cuales son más fuertes durante el estro en ovinos y bovinos (Hawk, 1975; Ruckebusch y Bayard, 1975; Ruckebusch y Bueno, 1976), son capaces de mover el esperma inmóvil y objetos inertes. Oleadas contráctiles uterinas son dirigidas en dirección al cérvix y a los oviductos, y la orientación predominante se vuelve superior durante la segunda mitad del estro en ovejas (Crocker y Shelton, 1973; Hawk, 1975; Toutain *et al*, 1985). El transporte pasivo del esperma uterino puede ser más importante para la remoción del esperma que para el transporte de la población de esperma fertilizante. Debido a la forma aplanada de la cabeza del esperma mamífero y su golpe flagelar planar, el esperma tiende a ser capturado por las superficies (Rotschild, 1963; Phillips, 1972; Katz *et al*, 1989) a lo largo de los cuales ellos nadan muy rápidamente (Katz y Blake, 1975) (citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

Después de ubicar quirúrgicamente esperma en el endocérvix de la oveja, Lightfoot y Restall (1971); citados por Drobnis y Overstreet (1992), encontraron que el esperma mótil entró en el cérvix y fue retenido, mientras que el inmóvil entró en el cérvix y rápidamente desapareció. Es posible que las olas uterinas dirigidas hacia el cérvix, junto con secreciones de mucus continuas puedan funcionar para remover menos esperma luminal mótil desde el tracto, o para limitar su acceso hacia el oviducto.

La conjunción uterotubal (CUT) actúa como un esfínter fisiológico, restringiendo el acceso del esperma al itsmo oviductal. El mecanismo por el cual la CUT restringe la entrada del esperma no está claro ni es conocido en que escala el esperma puede ser seleccionado por características fisiológicas particulares (Hafez y Black, 1968; citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

Hunter y colaboradores han determinado el intervalo de tiempo (después de la copulación) entre la primer entrada del esperma competente en el oviducto y el tiempo, cuando suficiente esperma está presente para asegurar la máxima fertilización de los oocitos. Se encontró que éste intervalo es de ocho a diez horas en ovejas (Hunter *et al*, 1980; Hunter *et al*, 1982).

Una vez que el esperma entró en el itsmo de la oveja, el número de espermias oviductales se incrementa inicialmente paralelamente con el número de espermias en el útero. El número de espermias uterinos se incrementa muy poco entre 8 y 24 horas

después de la copulación, pero el espermatozoide se incrementa 200 veces en ese intervalo (Hawk, 1983), el que incluye el periodo crítico cuando la población de espermatozoides fertilizantes es establecida (Hunter *et al*, 1980).

No es conocido si el espermatozoide regresa al útero y es repuesto por nuevo espermatozoide uterino, pero el espermatozoide no entra en el ampolla oviductal hasta justo antes de que ocurra la ovulación (Drobnis y Overstreet, 1992).

Para estudiar que tan pronto la población de espermatozoides capaz de fertilizar pueda progresar dentro del canal cervical, los contenidos vaginales fueron lavados (flushing) con una solución detergente en diferentes intervalos después de la cópula en el comienzo del estro. Lavados a los 3 minutos después de la cópula no se evitó la fertilización en 44 % de los casos, mientras lavados similares realizados a los 6 o 9 minutos previnieron completamente la fertilización en un total de 26 animales. Se concluye que al menos 30-60 minutos podrían ser requeridos para colonización adecuada del cérvix con una población de espermatozoides fertilizadores bajo las condiciones empleadas en el experimento. Las cópulas múltiples o cercanas al momento de ovulación podrían actuar reduciendo ese intervalo (Hunter y Nichol, 1993).

Mattner y Braden y Mattner (1969), citados por Hawk (1983), encontraron gran número de espermatozoides en oviductos de ovejas sacrificadas 5 o 10 minutos después de la cópula. El espermatozoide no necesita estar vivo para ser transportado rápidamente a los oviductos. Mattner y Braden (1969) recuperaron el espermatozoide muerto de carnero de los oviductos de ovejas unos pocos minutos después de la inseminación.

Schott y Phillips, citados por Hawk (1983), encontraron que más ovejas tenían espermatozoide en el segmento anterior de los oviductos que en el segmento anterior del cérvix o en el cuerno uterino a los 15 a 40 minutos después de la cópula. Estos resultados sugieren que el espermatozoide que alcanzó los oviductos en unos pocos minutos, al menos en ovejas y conejos, representa una pequeña proporción de lo inseminado (transportado rápidamente a través del tracto), mientras el volumen principal de espermatozoide se mantiene en la vagina y el cérvix.

2.1.5. - Comportamiento del espermatozoide cerca de la ovulación:

Existe evidencia suficiente de que en ovinos (Hunter y Nichol, 1983), bovinos (Hunter y Wilmut, 1983), y suinos (Hunter, 1984), el espermatozoide es retenido en los dos centímetros iniciales del ístmus oviductal hasta cerca del momento de la ovulación. No hay esfínter anatómico presente en la conjunción ampular ístmica, los mecanismos de la retención del espermatozoide ístmico y la liberación han sido las materias de considerable experimentación y debate (Overstreet, 1983).

Cambios en la contractilidad oviductal ocurren durante el periodo periovulatorio

(Salomy y Harper, 1971; Talo, 1974) y ahí hay evidencias de corrientes pro-ovario generadas en ese momento las cuales pueden propulsar el esperma al ampulla (Blandau y Gaddum-Rosse, 1974; Battalia y Yanagimachi, 1979, 1980). Esos cambios en la función oviductal pueden ser sincronizados con la ovulación mediante esteroides ováricos (Hunter, 1988).

Harper (1973) especuló que los productos de ovulación eran requeridos para liberar el esperma del itsmo oviductal. Alternativamente, el contacto con fluido folicular o componentes cúmulos, los cuales tienen la habilidad de estimular la capacitación del esperma y la hiperactivación *in-vitro*, puede permitir al esperma escapar del itsmo (Yanagimachi, 1981). Secreciones oviductales periovulatorias, bajo control hormonal, pueden tener actividad estimulante en el esperma (Suarez *et al*, 1990) (citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

El transporte del esperma fue menos eficiente en ovejas copuladas tarde en el estro, alrededor de la ovulación, que en ovejas copuladas tempranamente en estro (Hawk, 1983).

2.1.6.- Reservorio espermático:

Como el esperma tiene reservas limitadas de metabolitos (Mann, 1964; citado por Drobnis y Overstreet, 1992) y tiene muy poco o nada de sistemas celulares funcionales para sintetizar degeneramiento o elementos celulares dañados, su período de sobrevivencia a la temperatura del cuerpo es muy limitada. *In-vivo*, el esperma es también materia atacable por células fagocíticas.

Ha sido largamente creído que regiones específicas del tracto femenino actúan como reservas, las cuales pueden mantenerlo en un estado funcional por un extendido período de tiempo. El itsmo oviductal y el cérvix son los lugares más probables para la reserva de espermas.

En ovejas el número de espermas en el endocérvix 2 horas después del apareamiento está correlacionado con el número de espermas en itsmo oviductal en el momento de la fertilización (Crocker *et al*, 1975; Hawk y Conley, 1975). En estas especies los tratamientos que dificultan el transporte del esperma, incluyendo sincronización hormonal del estro, remoción del cuerpo lúteo, y la presencia de un dispositivo intrauterino, reducen el tamaño de las poblaciones de esperma en el endocérvix y en el itsmo oviductal así como disminuyen la tasa de fertilización (Hawk, 1973; Hawk y Conley, 1975; Hawk y Cooper, 1978; Hawk *et al*, 1981; citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

Hunter y colaboradores han llevado a cabo un número de experimentos ligando las distintas partes del tracto genital de ovinos y bovinos; los cuales demuestran que una

población de espermatozoides suficiente para la fertilización está presente en la región istmo-oviductal cerca de las 6-10 horas post-eyacuación (Hunter, 1988). A raíz de esa información se ha concluido que un reservorio cervical es innecesario en rumiantes (Hunter, 1985, 1988).

El hecho de que la población inicial de espermatozoides sea suficiente para asegurar la fertilización en rumiantes no impide la posibilidad de que el espermatozoides de arribo tardío desde el cérvix pueda haber participado en fertilización si la ligadura no hubiera existido (Drobnis y Overstreet, 1992).

Quinlan *et al.*, citado por Hawk (1983), identificó el cérvix como el sitio de reserva de espermatozoides en la oveja porque un gran número de espermatozoides mótil fue mantenido en dicha parte del tracto genital.

Bajo número de espermatozoides en el segmento anterior del cérvix a 2 horas después de inseminación reduce el número de los mismos en los oviductos alrededor de la ovulación y reduce la fertilidad. Aparentemente, el segmento anterior del cérvix es el sitio de un esencial reservorio de espermatozoides en la oveja (Hawk, 1983).

Cantidad desconocida de espermatozoides, indudablemente una pequeña proporción de lo inseminado, pasa a través de los oviductos y dentro de la cavidad del cuerpo. El espermatozoides se mantiene en el tracto reproductivo de ovejas, vacas y cabras por al menos 48 a 72 horas después de la inseminación, la mayoría de ese espermatozoides está probablemente en fosas y criptas en el tracto genital y parcialmente protegido de los fagocitos (Hawk, 1983).

2.1.7.- Destino del espermatozoides no fertilizante:

Cerca de 2 horas de inseminación intra-uterina (Lighthfoot y Restall, 1971) o inseminación cervical (Dobrowolski y Hafez, 1970; El-Banna y Hafez, 1970; Lighthfoot y Restall, 1971), el 85-90 % del espermatozoides depositado no es encontrado más en el tracto reproductivo femenino de ovinos y bovinos (citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

La mayoría del exceso de espermatozoides se pierde desde el tracto femenino por expulsión vía vaginal. Estudios en roedores, conejos y especies de animales domésticos sugieren que una gran proporción del espermatozoides no fertilizante que se mantiene en el tracto es eventualmente removido por fagocitos (Bedford, 1972; Austin, 1975; Overstreet, 1983). Los números de células fagocíticas en el tracto se incrementan en el tiempo, y los decrecientes números de espermatozoides son encontrados asociados con esas células (Austin, 1957; Bedford, 1965; Mattner, 1968; Overstreet *et al.*, 1978).

Cohen y colaboradores (1975), han propuesto un rol activo para el sistema inmuno-femenino en la selección del espermatozoides fertilizante. Ellos han reportado la secreción de inmunoglobulinas dentro del lumen del tracto femenino en asociación con la

reacción leucocítica. El espermatozoides-anticuerpo es aparentemente removido del tracto así como el espermatozoides no unido a anticuerpo se vuelve fertilizante y es guardado en el istmo oviductal (Cohen y Tyler, 1980; citados por Drobnis y Overstreet, 1992). Estos autores observaron el espermatozoides con anticuerpos unidos en frecuencia decreciente a lo largo del tracto y muy pocos fueron encontrados en el oviducto. Ellos concluyeron que la población de espermatozoides fertilizante tiene como recurso entrar primero en el oviducto después de la cópula, lo que significa evitar la mediación de las inmunoglobulinas en la remoción del espermatozoides.

Mattner encontró que números significativos de espermatozoides se mantenían asociados con las superficies epiteliales luego de ser recubiertos por fluidos, particularmente cerca de las criptas cervicales (Drobnis y Overstreet, 1992).

El espermatozoides muerto depositado en la oveja entra al cérvix solo en números relativamente pequeños, manteniéndose en el lumen y no entrando en las fosas cervicales, y se pierde enseguida probablemente por drenaje al exterior (Hawk, 1983).

Según Hawk (1983), sólo un pequeño porcentaje del espermatozoides depositado en la vagina de la vaca u oveja en la cópula natural entra al cérvix, y solo un pequeño porcentaje de éste alcanza el útero y oviductos. La mayoría del espermatozoides es rápidamente perdido al exterior mediante expulsión o drenaje. Fagocitosis por leucocitos probablemente cuentan para el destino de la mayoría del espermatozoides en el tracto reproductivo femenino que no se pierde al exterior por drenaje.

2.1.8.- Penetración de las secreciones del oocito *in vivo*:

En los rumiantes el "cúmulus oophorus" está parcial o totalmente disperso del ovocito en el momento de la fertilización (Lorton y First, 1979; Crozet, 1984; Crozet y Dumont, 1984; Crozet *et al*, 1987), y en todas las especies los oocitos totalmente desprendidos del cúmulus son capaces de ser fertilizados (Moore y Bedford, 1978; Cuasnicu y Bedford, 1988). Cerca del fin de la vida fértil del oocito los recubrimientos pueden perderse para facilitar la fertilización cuando el número de espermatozoides es bajo, o la cópula se ha demorado.

Al momento de fertilización muy pocos espermatozoides están presentes en el ampulla oviductal, tan pocos como uno a 15 por oocito (Olds, 1970; Nichol y McLaren, 1974; Yanagimachi y Mahi, 1976; Shalgi y Kraicer, 1978; Overstreet *et al*, 1978; Hunter, 1981; Cumminis, 1982; Cumminis y Yanagimachi, 1982; Smith *et al*, 1987; Smith y Yanagimachi, 1989; citados por Drobnis y Overstreet, 1992). Las características requeridas por esos espermatozoides (por ejemplo superficie adecuada, motilidad) para penetrar las secreciones del oocito *in vivo* son desconocidas.

En vacas y ovejas copuladas, el acrosoma vesiculado remanente está presente en la zona superficial de los oocitos en asociación con el espermatozoide penetrante (Crozet, 1984; Crozet y Dumont, 1984; Crozet *et al.*, 1987; citados por Drobnis y Overstreet, 1992), sugiriendo que ese es el sitio de la reacción acrosómica en estas especies.

Los golpes flagelares asimétricos aparecen como una palanca forzando a la cabeza del espermatozoide dentro de la oocito, y esos golpes producen fuerzas de una magnitud capaz de romper las uniones moleculares (Drobnis *et al.*, 1988c; citados por Drobnis y Overstreet, 1992).

2.1.9- Papel de las hormonas:

Interacciones de la concepción con el sistema inmune pueden involucrar respuestas inmunes antiesperma o anticonceptivas que limitan el éxito de la preñez. La progesterona juega un rol central en la inhibición de respuestas inmunes en acciones que son mediadas al menos en parte a través de la secreción endometrial de las llamadas proteínas de la leche uterina (Hansen, 1995).

La sobrevivencia del espermatozoide y el transporte en el estro de ovejas es reducida drásticamente por pasturas con alto contenido de estrógenos y por regulación del celo con progestágenos o prostaglandina F_{2α} (Hawk, 1983).

Ovinos y bovinos alimentados con forraje estrogénico pueden sufrir daños en las funciones ováricas, a veces acompañadas de tasas de concepción reducidas e incrementos en las pérdidas embrionarias. Ovejas expuestas al estrógeno por períodos prolongados pueden sufrir una segunda forma de infertilidad que es permanente, causada por acciones del desarrollo del estrógeno durante la vida adulta. El cérvix se vuelve defeminizado y pierde su habilidad de contener al espermatozoide, por lo que las tasas de concepción son reducidas aunque las funciones ováricas se mantienen normales (Adams, 1995).

El mucus cervical es un medio esencial para el movimiento del espermatozoide dentro y a través del cérvix y para el establecimiento de las poblaciones del mismo en las fosas cervicales y criptas. Las hormonas ováricas controlan las propiedades estructurales, físicas y reológicas del mucus cervical, con estrógeno incrementando la cantidad de mucus secretado y cambiando las propiedades del mismo para facilitar la penetración del espermatozoide (Hawk, 1983).

Las contracciones uterinas de bovinos y ovinos son débiles y localizadas durante la fase luteal del ciclo estral. Las contracciones durante el estro bajo influencias estrogénicas son frecuentes, fuertes y usualmente propagadas a lo largo del cuerno uterino (Hawk, 1983).

La regulación del estro en ovejas con progestágenos o prostaglandina $F2\alpha$ a veces resulta en baja fertilidad, particularmente después de inseminación con semen diluido (Hawk, 1983). Robinson y colaboradores reportaron que la falla del transporte del esperma era la causa de tasas de baja fertilización en ovejas inseminadas en sincronización de celo con progestágenos. Problemas de fallas en el transporte del esperma fueron similares en ovejas con regulación del celo con prostaglandina $F2\alpha$ (Hawk, 1983).

La remoción del cuerpo lúteo en la mitad del ciclo (día 10), causando un abrupto declive en las concentraciones de la progesterona del plasma, interrumpe marcadamente los mecanismos de transporte de esperma en el estro 2 días después. La remoción del cuerpo lúteo al día 3 o 15 ha afecta menos al transporte del esperma (Hawk, 1983).

El mucus cervical ha sido investigado, y el uso de progestágenos sintéticos para regular el estro tanto ha disminuido como aumentado la producción de mucus. El estradiol exógeno administrado por 12 días antes del estro o un DIU no tuvieron efecto aparente en las secreciones de mucus (Hawk, 1983).

2.1.9.1- Mejoras en la retención y transporte del esperma:

Algunos compuestos cuando se agregan al semen usado para inseminación o inyección dentro de las hembras cerca de la inseminación, han incrementado el número de espermatozoides recabado de los oviductos. Esos componentes incluyen prostaglandina $F1$ y $F2\alpha$ combinado y agregado al semen de carnero o inyectado a las ovejas, y estradiol 17β inyectada en conejas y ovejas. La adición de prostaglandina $F2\alpha$ y $E2$ al semen de carneros mejora la fertilidad de ovejas inseminadas artificialmente (Hawk, 1983).

No se conoce si la prostaglandina $F2\alpha$ y el estradiol (que inducen la retención de esperma en la vagina y cérvix) proveen de bases para incrementar el número de espermatozoides en útero y oviductos o si esos compuestos activamente estimulan el transporte del esperma (Hawk, 1983).

La similitud entre el estradiol y prostaglandina $F2\alpha$ en el incremento del número de espermatozoides a través del tracto reproductivo sugiere que la retención de esperma en la vagina y cérvix pueda haber sido el factor responsable del incremento en el número de espermatozoides que alcanza los oviductos. Mecanismos mediadores podrían incluir un efecto de los compuestos sobre secreciones del tracto, sobre propiedades adhesivas de la membrana del esperma, o sobre actividad metabólica del esperma en sí mismo (Hawk, 1983).

Estradiol-17B, prostaglandina F2 α , fenilefrina y ergonovina incrementaron la cantidad de ovocitos mantenidos con un número de esperma accesorio. Los resultados demuestran que esos compuestos pudieron incrementar la tasa de fertilización, aparentemente mediante el incremento del número de espermias en el oviducto en el entorno de la ovulación (Hawk, 1983).

2.2 CONSERVACIÓN DE SEMEN DE CARNERO

2.2.1- Generalidades:

El desarrollo de técnicas de I.A. ha permitido la rápida diseminación de material genético desde un pequeño número de machos superiores a un gran número de hembras. El semen tradicionalmente ha sido almacenado tanto en forma fresca (líquida) como en estado criopreservado, para todas las especies de animales domésticos (Shannon, 1978; Johnson *et al.*, 1981; Weitze, 1991; Maxwell y Watson, 1996; citados por Vishwanath y Shannon, 1997).

Algunos investigadores han examinado la conservación de semen en i) un estado líquido (no congelado), usando temperaturas reducidas u otras formas para disminuir el metabolismo del esperma y ii) un estado congelado el cual involucra congelación y preservación del espermatozoide a temperaturas bajo cero (Maxwell y Salamon, 1993).

La principal ventaja de usar el semen líquido no congelado es que la fertilidad es mantenida con bajos números de espermatozoides en la inseminación. Con menos de 1 millón de espermatozoides por dosis, las tasas de concepción con semen líquido son similares a aquellas con semen congelado con alrededor de 15 millones de espermatozoides (Vishwanath y Shannon, 1997).

Aunque la viabilidad del espermatozoide, juzgada por su motilidad, es mantenida durante muchos días de almacenamiento, el test real de integridad funcional es su capacidad fertilizante (Maxwell y Salamon, 1993).

El plasma seminal solo provee una protección limitada para el espermatozoide contra los cambios en la temperatura. Para almacenamiento a temperaturas reducidas, es necesario diluir el semen en soluciones especiales. Estos generalmente deben tener un pH adecuado y capacidad buffer, osmolaridad apropiada, y deben proteger al espermatozoide del daño criogénico (Salamon y Maxwell, 1995).

La inseminación con esperma congelado de carnero y descongelado resultó en una reducida fertilidad, la cual decreció con el aumento de los días de almacenamiento (Evans y Maxwell, 1987; Smith *et al.*, 1993; citados por Vishwanath y Shannon, 1997). Esto es visto como un factor limitante para el uso de la I.A. en la producción ovina, debido a la corta vida fertilizante del semen almacenado a temperatura ambiente (Vishwanath y Shannon, 1997).

La congelación y descongelación causan daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales a una significativa proporción de espermatozoides. Esos cambios están acompañados por una reducción en motilidad, transporte dificultoso y disminución en la

viabilidad del espermatozoide en el tracto genital femenino, lo que reduce la fertilidad después de una inseminación cervical (Salamon y Maxwell, 1995b).

La preservación exitosa del espermatozoide después de una congelación-descongelación depende de un número de factores que interactúan, tales como el tipo de diluyente y su composición, el método de adición y concentración del crioprotector, dilución precongelante y procesamiento del semen, tasas y métodos de congelamiento y descongelamiento (Salamon y Maxwell, 1995).

El éxito del congelamiento depende en gran medida de la tasa de dilución de semen. Originalmente, el semen fue diluido para proteger al espermatozoide durante el enfriamiento, congelamiento y descongelamiento, pero la tasa de dilución fue a veces cambiada por razones técnicas tales como incrementar el número de hembras que podrían ser inseminadas con cada eyaculado, o para estandarizar el número de espermatozoides en cada dosis de semen congelado-descongelado (Salamon y Maxwell, 1995).

Puede ser obtenida alta fertilidad después de la deposición de semen congelado dentro del útero; el desarrollo del método laparoscópico de inseminación uterina condujo a un incremento en el uso de semen congelado (Eppleston y Maxwell, 1993).

Alrededor de 20-30% de embriones de ovejas normalmente se pierden hasta el momento de la implantación (Edey, 1976; citado por Maxwell y Salamon, 1993). Un declive en la fertilidad y el incremento simultáneo de anomalías en el desarrollo embrionario asociados con el envejecimiento del espermatozoide han sido observados en muchas especies (Salisbury *et al.*, 1976; Salisbury y Hart, 1970; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

Aparte de la pobre sobrevivencia del espermatozoide en el tracto genital femenino, la temprana mortalidad embrionaria es considerada como una de las principales causas de baja fertilidad en ovejas después de la inseminación con semen conservado líquido (Rabocev, 1965, 1966; Lopyrin y Manujlov, 1967; Lopyrin y Rabocev, 1968; Lopyrin, 1971; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.2 Diluyentes para almacenaje líquido:

2.2.2.1 Leche como diluyente:

El éxito de éste diluyente ha sido atribuido a su fracción proteica, la cual puede actuar como un buffer contra los cambios de pH (Jones, 1969; Watson, 1979) y como un agente quelatante contra cualquier metal pesado presente (Jones, 1969), esto puede también proteger parcialmente al espermatozoide durante la dilución (Blackshaw, 1953)

y reducción de temperatura para almacenaje (Choong y Wales, 1962, citados por Maxwell y Salamon, 1993). Para la dilución del semen con leche, ésta debe ser calentada (92-95 °C) por 8-15 minutos para inactivar la lactenina en la fracción proteica, la cual es tóxica para el espermatozoide (Flipse *et al.*, 1954; citado por Maxwell y Salamon, 1993). Jones (1965), citado por Maxwell y Salamon (1993), reportó que calentando la leche a 85 °C por 5 minutos se removían los factores tóxicos en la leche entera, pero esto no tenía efecto en la leche descremada reconstituida.

La leche de vaca ha sido preferida a la de otras especies (Maxwell y Salamon, 1993). En años recientes, la leche "larga vida" (UHT) comercialmente disponible se ha presentado como un diluyente satisfactorio para semen fresco (Evans y Maxwell, 1987), pero ese producto no ha sido investigado para almacenamiento de semen de carnero a bajas temperaturas (Maxwell y Salamon, 1993).

La motilidad del espermatozoide en semen diluido con leche es superior mejor después de almacenarlo a 15°C que a 4°C. La mejor fertilidad se obtiene cuando el semen diluido con leche es almacenado a 15°C por hasta 26 horas. En reportes subsecuentes, doble inseminación con semen almacenado con leche descremada a 15°C por 8 horas y 12 horas produjo tasas de corderos de 72% (Colas 1972) y 71% (Colas 1975b) respectivamente (Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.2.2 Diluyentes lácteos comparados con diluyentes sintéticos:

Emmens y Robinson (1962); citado por Maxwell y Salamon (1993), concluyeron que la leche se compara favorablemente con los diluyentes sintéticos (ejemplo: citrato glucósico - yema de huevo).

Algunas investigaciones sugieren que la leche descremada puede ser mejor que la leche entera para el almacenamiento de semen a 2-5 °C. Semen diluido 11ª parte con leche reconstituida descremada, calentada, y almacenada a 2-4 °C por 12 horas antes de la inseminación resultó en una tasa de nacimiento de corderos de 51% (Dauzier, 1956; citado por Maxwell y Salamon, 1993). La fertilidad fue mejorada cuando se adicionaron antibióticos a la leche descremada (65 % de tasa de nacimiento), siendo mucho más baja (6-25 %) para semen almacenado por 12 horas en diluyentes sintéticos

Blackshaw (1960); citado por Maxwell y Salamon (1993), no encontró diferencias entre la leche y el citrato de yema de huevo como diluyentes para incubación (37°C) y subsecuente almacenaje (5°C) de semen de carnero. Salamon (1962), sugirió que los diluyentes lácteos conteniendo antibióticos podrían ser tan efectivos como el citrato buffereado para almacenamiento frío de semen de carnero; la leche descremada comprobó una superioridad sobre los diluyentes sintéticos en el mantenimiento de la motilidad del espermatozoide durante 4 días de almacenamiento a 5°C (Martin, 1966; citado por Maxwell y Salamon, 1993).

En contraste con los hallazgos anteriores, algunos investigadores han encontrado que los citratos buffereados son mejores que la leche para el almacenamiento líquido de semen de carnero (Filimon *et al.*, 1956; Schindler y Amir, 1961; Salamon y Robinson, 1962; Özkoca, 1964a; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

Colas (1975a), sugirió que los diluyentes sintéticos eran menos apropiados que la leche descremada reconstituida en la dilución de semen de carnero para inseminación en estro sincronizado, debido al contenido de yema de huevo de la mayoría de los medios sintéticos. Como la duración del transporte del esperma a través del tracto femenino se alarga por tratamientos hormonales en ovejas (Quinlivan y Robinson, 1967), Colas y Courot (1976) sugirieron que podrían esperarse bajas tasas de concepción en ovejas con sincronización de celos después del uso de diluyentes que contengan yema de huevo.

Por otra parte Feredean *et al.* (1967); citados por Maxwell y Salamon (1993), encontraron que la adición de 5% de yema de huevo y 1% de glucosa a la leche descremada mejoraría la motilidad del espermatozoide durante el almacenaje a 0°C por 96 horas.

2.2.2.3 Otros diluyentes:

El reemplazo del citrato buffer con 4% de glicerina (Ahmed, 1955), o adición de glicerina al citrato buffer (Saha y Sing, 1958; Schindler y Amir, 1961; Lunca *et al.*, 1961; Shannon, 1964; citados por Maxwell y Salamon, 1993), prolongaron la sobrevivencia del espermatozoide de carnero durante almacenamiento a 4°C. Otros autores no encontraron beneficios en el uso de glicerina en lugar de los diluyentes tradicionales citrato- buffers (Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.2.4 Buffers orgánicos como componentes de diluyentes:

Muchos estudios se han concentrado en el uso de buffers orgánicos. Estos tienen mejor capacidad buffer que el fosfato o citrato (Good *et al.*, 1966; Watson, 1979), son relativamente no tóxicos para las células vivas (Nahas, 1961), y podrían penetrar la célula espermática actuando como buffers intracelulares contra cambios de pH (Steinbach, 1963), o pueden aumentar la tolerancia de la célula a un incremento celular de cationes monovalentes (McLachlan y Gorham, 1961, Maxwell y Salamon, 1993).

Frecuentemente buffers orgánicos incrementan la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es altamente congelado (Yassen y Foote, 1967; citado por Maxwell y Salamon, 1993), y puede ser también importante para otros métodos de preservación de semen. Es limitada la información en cuanto a varias concentraciones de éstos buffers como principales componentes de diluyentes, y en su

combinación con otros agentes (Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.2.5 Azúcares como componentes de diluyentes:

Aunque sólo la fructosa está presente en el semen de carnero, el espermatozoide puede metabolizar glucosa y manosa cuando estos azúcares están incluidos en los diluyentes para almacenamiento (White *et al.*, 1954; Mann, 1964; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

La inclusión de lactosa ha sido reportada como mejoradora de la motilidad del espermatozoide mantenido a 37°C (Choong y Wales, 1962; Wales y Choong, 1963; Martin, 1966; citados por Maxwell y Salamon, 1993), y la sobrevivencia a 5°C fue mejor cuando los azúcares tales como fructosa, glucosa, lactosa o sucrosa fueron agregados a soluciones electrolíticas simples (Martin, 1966; citado por Maxwell y Salamon, 1993).

Desde algunos estudios parecería ser que ciertos azúcares en los diluyentes proveen una fuente de energía para los espermatozoides durante el almacenaje (ej.: glucosa y fructosa), mientras otros podrían actuar manteniendo o incrementando la presión osmótica del diluyente (por ejemplo sucrosa y lactosa). La aptitud de los azúcares para mantener el metabolismo del espermatozoide en diluyentes sintéticos también parecería depender de la temperatura de almacenamiento (Vantienhoven *et al.*, 1952; Lapwood y Martin, 1966; McGann, 1978; Watson, 1979; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.2.6 Yema de huevo como componente en diluyentes:

La yema de huevo ha sido incluida en diluyentes sintéticos para protección del choque frío, la cual es provista por su fracción fosfolipídica (Milovanov, 1962). Jones y Martin (1973), citado por Maxwell y Salamon, (1993); reportaron que la inclusión del 3% de yema de huevo en un diluyente gluco-fosfático reduce la frecuencia de cambios en los acrosomas y piezas medias del espermatozoide de carnero enfriado a 5°C y almacenado a esa temperatura hasta por 72 horas. Las fracciones proteicas no dializables de la yema de huevo proveen la mejor protección al espermatozoide de carnero durante el almacenamiento en frío (Watson y Martin, 1975), sugiriendo que la baja densidad lipoproteica fue la fuente de su protección (Maxwell y Salamon, 1993).

Altas concentraciones de yema de huevo en diluyentes de esperma de carnero para almacenaje en frío podrían ir en contra de la fertilidad. Ninguna explicación ha sido dada para ese efecto inhibitor, siendo que la presencia de yema de huevo en diluyentes generalmente ha sido atribuida como reductora de la pérdida de enzimas acrosómicas, previniendo cambios degenerativos en la estructura del acrosoma durante el almacenaje

a 5°C (Jones y Martín, 1973; Martín y Richardson, 1976; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.3 Fertilidad después del almacenamiento líquido:

Salamon y Robinson (1962), mostraron que con semen fresco, no diluido o diluido con leche caliente de vaca o yema de huevo glucosa-citrato, pueden ser esperados 75-70% de corderos nacidos de ovejas inseminadas en un ciclo simple, y 75-80% con inseminación en dos ciclos. Aunque se encontró que la fertilidad declinaba rápidamente si el semen era almacenado en frío por 24, 48, y 72 horas, por lo cual las tasas de nacimiento fueron 50, 30, y 20% respectivamente.

Salamon *et al.* (1979), citado por Maxwell y Salamon (1993); depositó el semen directamente dentro del cuerno uterino de ovejas en celo, mostrando que la capacidad fertilizante del espermatozoide de carnero se mantiene hasta por 10 días de almacenamiento a 5°C. Pese a esto, las tasas de nacimiento después de la inseminación cervical declinaron substancialmente después de 3 días de almacenamiento en frío.

Las células espermáticas progresivamente pierden la viabilidad cuando se almacenan en un medio a temperatura ambiente (Shannon, 1978; citado por Vishwanath y Shannon, 1997). La relación entre la cantidad del semen (nº de espermatozoides) y la calidad (potencial fertilizante) fue primariamente descrita por Salisbury y VanDemark (1961). El punto principal en este concepto es que hasta un nivel determinado, la fertilidad depende del número de espermatozoides. Una vez que ese nivel es alcanzado, la fertilidad no es afectada por incrementos en la concentración de espermatozoides (Vishwanath y Shannon, 1997).

Mientras la habilidad de penetración del espermatozoide se mantiene intacta, los cambios intracelulares durante el almacenamiento causan daños irreparables a la mitocondria o al genoma haploide del núcleo resultando en un ovocito fecundado no viable. Ambas posibilidades necesitan ser consideradas para valorar los principales puntos del daño del espermatozoide durante el almacenamiento líquido (Vishwanath y Shannon, 1997).

En un sistema parcialmente aerobio la producción de oxígeno-reactivos es inevitable (Mann y Lutwak-Mann, 1975; Fridovich, 1978, 1981; Mann *et al.*, 1980; citados por Vishwanath y Shannon, 1997). Las reacciones que producen los radicales libres (O₂, H₂O₂, y OH) son más activas a temperaturas altas de almacenamiento que en estado criopreservado. El peróxido es el más perjudicial de todos los pro-oxidantes formados. La producción de radicales libres, tanto por peroxidación lipídica extracelular o *in-situ* por el camino de fosforilación oxidativa en la mitocondria podrían dañar la membrana nuclear (Vishwanath y Shannon, 1997).

La excesiva producción de especies reactivas de oxígeno perjudica la motilidad y

capacidad para fertilización. Los antioxidantes pueden mejorar la fertilidad de los espermatozoides congelados pero no frescos (Maxwell y Watson, 1996).

El movimiento progresivo es una importante función para permitir que el espermatozoide alcance el sitio de fertilización. La propulsión requiere un suplemento de ATP, el cual puede ser generado tanto en presencia de oxígeno mediante respiración asociado a la fosforilación oxidativa o anaeróbicamente mediante fructólisis (Vishwanath y Shannon, 1997).

2.2.4 Factores que influyen en la fertilidad después del almacenamiento líquido:

Los cambios más obvios en el espermatozoide durante el almacenamiento líquido son un declive gradual en la motilidad y en la integridad morfológica, y un rápido descenso en la fertilidad (Rathore y Mukherjee, 1966; Lopyrin y Rabocev, 1968; Jones y Martin, 1973; Müller *et al.*, 1977; Tasseron *et al.*, 1977; Maxwell, 1978; Zlatarev *et al.*, 1988; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

Lopyrin y Rabocev (1968), citados por Maxwell y Salamon (1993); sugirieron que las principales causas de la pobre fertilidad eran el descenso en la viabilidad del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino y la mortalidad embrionaria.

2.2.5 Viabilidad y capacidad fertilizante del espermatozoide:

El almacenamiento del semen en un estado frío o a temperatura ambiente afecta la viabilidad del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino. De acuerdo con Lopyrin (1971), después de la inseminación cervical en el comienzo del celo en la oveja y con subsecuentes lavados (flushing) de los oviductos para examinación de la fertilización del ovocito, los tiempos de sobrevivencia del espermatozoide en el canal cervical fueron alrededor de 27 horas para semen fresco, 22-23 horas después de 24 horas de almacenamiento, y 19-22 horas después de 48 horas de almacenamiento. El espermatozoide almacenado a temperatura ambiente (16-18°C) sobrevive más que aquel mantenido a 0°C (Maxwell y Salamon, 1993).

La sobrevivencia del espermatozoide está también limitada en el oviducto. El espermatozoide fresco (juzgado por motilidad) sobrevivió por 9-10 horas, pero la sobrevivencia del esperma almacenado decreció a 6-7 horas y 5-4 horas después de 24 y 48 horas de almacenamiento respectivamente. (Lopyrin y Rabocev, 1968; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

Ivahnenko y Rak (1964), citados por Maxwell y Salamon (1993); atribuyeron la baja tasa de nacimiento después de una inseminación tubal con semen conservado a la fertilización de una proporción de ovocitos por espermatozoides de calidad pobre, lo

cual resultó en mortalidad embrionaria. Esos autores sugirieron que después de inseminaciones cervicales, los espermatozoides de pobre calidad serían incapaces de ascender al sitio de fertilización. Información adicional se requiere para determinar el rol que ocupa la unión uterotubal en la inseminación uterina, debido a que se piensa que esa área actúa como una barrera preovulatoria para el ascenso del espermatozoide después de la inseminación cervical o la cópula natural (Cummins, 1982; Hunter, 1984; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

2.2.6 Conservación de semen a -79°C y -196°C:

2.2.6.1 Diluyentes basados en citrato-azúcares:

Este medio tiene limitaciones cuando se adapta el semen de carnero, y mayoritariamente fue modificado. El espermatozoide de carnero puede tolerar una concentración de glucosa dos veces más que el nivel isotónico debido a la capacidad de los monosacáridos para permear la célula espermática y entonces nivelar el gradiente osmótico (Zhuravlj, 1982; citado por Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.6.2 Diluyentes basados en la leche:

La leche es un medio isotónico que contiene muchos componentes favorables para el mantenimiento de la viabilidad del espermatozoide, y fue usada largamente para extender el semen de toro. El semen de carnero también ha sido diluido con leche principalmente para uso fresco o almacenamiento líquido (Emmens y Robinson, 1962; Maxwell y Salamon, 1993; citados por Salamon y Maxwell, 1995). También ha sido adaptada para congelamiento de semen de carnero, mayoritariamente en forma reconstituida combinada con arabinosa, fructosa o yema de huevo (Blackshaw, 1955; Szumovski *et al.*, 1956; Jones, 1965, 1969b; Saxena y Singh, 1968; Vinha y Coubrough; 1972; Aamdal *et al.*, 1982; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.6.3 Diluyentes basados en lactosa:

El exitoso uso de la lactosa de la leche como el principal componente de diluyentes para semen congelado de toro estimuló su aplicación para semen de carnero.

Los disacáridos (lactosa y sacarosa) fueron más efectivos bajando la temperatura de cristalización durante el congelamiento que los monosacáridos, y eso fue incrementado cuando fueron combinados con EDTA-Na₂ y di-etilamina (Platov, 1973, 1988; citado por Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.6.4 Diluyentes basados en sacarosa

La sacarosa fue usada como el principal componente en diluyentes sintéticos porque se encontró que protegía la integridad del acrosoma del espermatozoide mejor que la glucosa, fructosa o lactosa (Milovanov y Sokolovskaja, 1980b; Marinov *et al.*, 1980; citados por Salamon y Maxwell, 1995). Como el esperma de carnero no contiene antioxidantes (no como otras especies), han sido agregados antioxidantes sintéticos a los diluyentes como sacarosa para inhibir la peroxidación de fosfolípidos, particularmente de ácidos grasos insaturados (Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.6.5 Diluyentes basados en Tris:

Visser y Salamon (1973, 1974a); citado por Salamon y Maxwell (1995), en test de fertilidad del semen diluido con tris (300 mM) más antibióticos y en pellets congelados en hielo seco, observaron tasas de corderos desde 30 a 57% después de inseminación cervical.

El diluyente Tris -glucosa elaborado por Salamon y Visser (1972) es ampliamente usado y recomendado para el almacenamiento congelado de semen de carnero (Salamon, 1976; Evans y Maxwell, 1987; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

Estudios realizados por Molinia *et al.*, (1994), reportan la exitosa inclusión de un rango de concentraciones de azúcar (30-210 mM.) en los diluyentes basados en TRIS-glucosa-yema de huevo-glicerol. Hubieron óptimas combinaciones de TRIS:azúcar, pero el tipo de azúcar no tuvo efecto sobre las características de la motilidad post-descongelación del espermatozoide de carnero congelado en pellets. Los experimentos no revelan ningún aumento del efecto crioprotector de diluyentes conteniendo altas concentraciones de azúcar sobre un diluyente control.

El Tris tiene poca capacidad buffer bajo pH 7.5, pero hay buffers anfóteros disponibles para el uso en el rango de pH 6-8 (Good *et al.*, 1966; citado por Molinia *et al.*, 1994b). En estudios específicos, mejoras en motilidad post-descongelación e integridad acrosómica de espermatozoides de carnero *in-vitro* fueron observados comparando dichos tampones con Tris-citrato (Salamon y Maxwell, 1995).

El espermatozoide de carnero tolera una amplia gama de osmolaridad del medio de congelación (250-400 mM) (Molinia *et al.*, 1994b). Podría haber un efecto crioprotector de los monosacáridos sobre los disacáridos en diluyentes anfóteros. Además, el espermatozoide en diluyentes que contienen disacáridos pierde su motilidad más rápido durante su incubación post-descongelación que en diluyentes conteniendo glucosa o fructosa posiblemente porque los monosacáridos son más metabolizables por parte del esperma (Mann, 1964; citado por Molinia *et al.*, 1994b).

Los estudios muestran que los buffers anfóteros podrían ser exitosamente incorporados dentro de los diluyentes para congelación de espermatozoides de carnero. La motilidad post-descongelación e integridad acrosómica es superior en diluyentes centrifugados conteniendo yema de huevo, a bajas tasas de dilución de semen (3-6 partes) y realizando una congelación en pellets, que en minitubos o pajuelas. Debería aún determinarse si el mejoramiento de la viabilidad post-descongelación del espermatozoide, congelado en esos nuevos diluyentes, podría ser reflejado en mejoras en la fertilidad (Molinia *et al.*, 1994b).

2.2.7 Agentes protectivos en los diluyentes:

Se ha determinado que un número importante de agentes actúan como elementos de protección del espermatozoide de mamíferos durante los procesos de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento. Glicerol y yema de huevo son las sustancias protectoras más comúnmente usadas para congelar semen de carnero

2.2.7.1 Glicerol:

El glicerol ha sido el agente crioprotector para el espermatozoide más ampliamente usado desde la demostración de su eficacia por Polge *et al.*, en 1949, citado por Salamon y Maxwell, 1995. El efecto protector es debido a su propiedad coligativa o a su atributo en mantenerse unido a la molécula de agua. El glicerol también actúa como un diluyente, y mediante el descenso del grado de disociación de las sales disminuye la presión osmótica del medio de congelación. La presión osmótica del diluyente sin embargo, no puede estar basada en la concentración de sus componentes, sino que también tiene que ser tenido en cuenta la habilidad de ese componente para permear las células espermáticas y por lo tanto cambiar el balance osmótico celular y extracelular (Salamon y Maxwell, 1995). De ésta manera el glicerol actúa osmóticamente debido a su habilidad para penetrar el espermatozoide de carnero (Nauk *et al.*, 1970; citado por Salamon y Maxwell, 1995), también tiene la propiedad de impedir la nucleación y formación de cristales de hielo (Farrant *et al.*, 1977a), y tiene un efecto bacteriostático (Milovanov, 1962) (Salamon y Maxwell, 1995).

Para el semen congelado de carnero mediante el método lento “convencional”, y usando principalmente diluyentes hipertónicos la mayoría de los investigadores encontraron que la óptima concentración de glicerol estaba entre 6-8%. Graham *et al.*, (1978); citado por Salamon y Maxwell, 1995; reportó que niveles de glicerol por encima de 6% eran perjudiciales para revivir a los espermatozoides post-descongelamiento.

Colas (1975a), sugirió que la concentración óptima de glicerol en semen diluido está también relacionada a su concentración final relativa de espermatozoides.

El nivel de glicerol incluido en diluyentes para almacenamiento de semen

congelado de carnero está limitada por su toxicidad (Fahy, 1986; citado por Salamon y Maxwell 1995), lo que depende de la tasa de enfriamiento y congelamiento, la composición del diluyente y el método de adición del glicerol.

El espermatozoide congelado rápido por el método de pellets dio la mejor sobrevivencia con 3-4% de glicerol (Platov, 1965, 1966; Lightfoot y Salamon, 1969a; Salamon, 1970; Bauer y Liebemberg, 1976; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

Aparte de la tasa de enfriamiento, la concentración óptima de glicerol también depende de la composición del diluyente y en particular de su presión osmótica (Salamon, 1968; Lightfoot y Salamon, 1969a). Además las concentraciones de glicerol podrían estar influenciadas por el nivel de yema de huevo en el diluyente, así como incrementos en las concentraciones de yema de huevo podrían reducir la cantidad requerida de glicerol (Watson y Martin, 1974; citado por Salamon y Maxwell, 1995).

El glicerol puede ser agregado al semen en una fracción diluyente separada (dilución en dos pasos), o por adición única del diluyente conteniendo el glicerol (método de un paso) (Salamon y Maxwell, 1995). Colas (1975a) sugirió que el glicerol podría ser algo tóxico para el espermatozoide en concentraciones hasta del 4%, y su efecto dañino es menor cuando se agrega a temperaturas cerca de 0°C. La aparente toxicidad del glicerol a concentraciones mayores que 4% podrían deberse al efecto osmótico resultado de una abrupta dilución del semen descongelado (Mazur, 1985; citado por Salamon y Maxwell, 1995).

Se encontró que la adición en un paso de la porción glicerolada antes del congelamiento (a 5°C) fue tan efectiva o mejor que la adición gradual en porciones divididas (Entwistle y Martin, 1972; Fiser y Fairfull, 1989; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

Salamon (1968) y Lightfoot y Salamon (1969a), citados por Salamon y Maxwell (1995), reportaron que una dilución única de semen con diluyente que contiene glicerol a 30°C (método de un paso) fue tan buena como una dilución en dos pasos, pero la eficiencia del método anterior dependía del componente azúcar del diluyente. Adición de glicerol en un paso a 30°C es práctico, y es un método exitoso y ampliamente usado para dilución de semen de carnero para almacenamiento congelado (Salamon, 1976; Evans y Maxwell, 1987).

Muchos agentes han sido examinados por su acción crioprotectora sobre el espermatozoide de carnero pero ninguno resultó ser mejor que el glicerol (Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.7.2 Otros agentes crioprotectores:

Además de los beneficios obtenidos de la yema de huevo durante el enfriamiento de semen a temperaturas cercanas a 0°C (Maxwell y Salamon, 1993), también confiere protección al espermatozoide cuando el semen es diluido, y durante el congelamiento y descongelamiento (Salamon y Maxwell, 1995). La yema de huevo preserva la motilidad e integridad de las membranas acrosómicas y mitocondriales del espermatozoide. Es también un buffer osmótico ya que en su presencia las células espermáticas son más tolerantes a diluyentes hipotónicos e hipertónicos (Jones y Martin, 1973; Smirnov, 1976; citados por Salamon y Maxwell, 1995). También ha sido sugerido que la yema de huevo protege durante el congelamiento mediante su unión a las membranas plasmáticas (Watson, 1975) y que tiene un efecto protector mayor para espermatozoides de toro que de carnero (Platov y Sevcova, 1967) (Salamon y Maxwell, 1995).

Para congelamiento de semen de carnero en ampollas, las concentraciones de yema de huevo de 3-6% fueron suficientes (Entwistle y Martin, 1972; Watson y Martin, 1975a), pero para congelamiento en pellets una concentración de 15% fue la óptima, aunque el efecto dependió de la composición del diluyente (Salamon y Lightfoot, 1969). Cuando se congela en pajuelas, 1.5-3% de yema de huevo tiene efectos similares en la motilidad post-descongelamiento, pero el daño al acrosoma fue menos severo en presencia de 1.5% que 3% (Watson y Martin, 1975a; citado por Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.8 Enfriamiento a 2-5°C y equilibración:

Tradicionalmente la equilibración ha sido vista como el tiempo total en el que el espermatozoide se mantiene en contacto con el glicerol antes del congelamiento, durante la cual éste penetra dentro de la célula espermática para establecer una concentración intra y extra-celular balanceada.

Con el método de dilución en dos pasos el contacto con el glicerol comienza a 2-5°C. Cuando la dilución en un paso es adoptada, la glicerolización empieza a 30°C. En ambos métodos se requiere un período de enfriamiento de 2-5°C, la duración generalmente varía de 1-3 horas (Salamon y Maxwell, 1995). Hoy en día el método de dilución en un paso con un medio glicerolizado es usado generalmente, y se recomienda congelar el semen después de 1.5-2 horas de enfriamiento a 5°C (Salamon, 1976; Evans y Maxwell, 1987). No se cree que haya evidencias convincentes sosteniendo que un largo período de enfriamiento/equilibración, o un procedimiento más complicado de dilución en dos pasos sea necesario (Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.9 Tasa de enfriamiento bajo 0°C y método de congelación:

Este parámetro puede influenciar significativamente la sobrevivencia del espermatozoide después del congelamiento en ampollas de vidrio, pellets o pajuelas.

Salamon (1968) reportó que después del enfriamiento del semen en ampollas, pajuelas y pellets, en cada caso con una tasa de enfriamiento diferente, la motilidad post-descongelamiento del espermatozoide fue mejor para semen congelado en ampollas y pellets que en pajuelas; pero el semen congelado por los tres métodos dio tasas de corderos pobres (Salamon, 1967).

El espermatozoide de carnero parece tolerar un rango de congelamiento de -79°C a -160°C (Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.10 Descongelación del semen:

En el proceso de congelación-descongelación la fase de calentamiento es tan importante para la sobrevivencia del esperma como la fase de enfriamiento (Mazur, 1985; citado por Salamon y Maxwell, 1995). El efecto depende de si la tasa de enfriamiento ha sido lo suficientemente alta para inducir congelamiento intracelular, o lo suficientemente baja para producir la deshidratación de la célula (Parks y Graham, 1992). En el caso anterior, el rápido descongelamiento es requerido para evitar la recristalización de hielo intracelular presente en el espermatozoide (Mazur, 1977; citado por Salamon y Maxwell, 1995). El espermatozoide descongelado a una tasa rápida podría estar expuesto por un menor tiempo al soluto concentrado y crioprotector (glicerol) (Robins *et al.*, 1976), y el restablecimiento del equilibrio intra y extracelular es más rápido que para el descongelamiento lento (Salamon y Maxwell, 1995).

Algunos trabajadores no encontraron diferencias en revivificar el espermatozoide después de descongelarlo a 38°C o a temperatura ambiente (Lopyrin y Loginova, 1958; citados por Salamon y Maxwell, 1995). En reportes anteriores el semen de carnero congelado en ampollas fue generalmente descongelado en un baño de agua a 37°C (Jones, 1965, 1969a, b; Salamon, 1967, 1968; Watson y Martin, 1972, 1973; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

Hay informes en donde el descongelamiento de pajuelas a 36-40°C o a 50-70°C no tuvo efecto sobre la motilidad post-descongelamiento o en la integridad acrosómica del espermatozoide (Pontbriand *et al.*, 1989) y nacimientos de corderos (Graham *et al.*, 1978; Colas, 1979; Costa, 1982; Mattos, 1982; Mejarada, 1988; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

El semen congelado en pellets podría ser descongelado en una solución (“descongelamiento húmedo”) o en tubos secos. Inicialmente se reportó como más ventajoso descongelar los pellets en una solución que en vías secas, y a 38-40°C que a temperaturas más bajas (Platov, 1965, 1966; Salamon, 1968). No solo la presencia sino también la composición de la solución descongelante influenció la recuperación de la motilidad del esperma, y el efecto dependió de la composición del diluyente congelante azúcar citrato-yema (Lightfoot y Salamon, 1969*b*; citados por Salamon y Maxwell, 1995). También se mostró que semen en pellets puede ser descongelado exitosamente a 37°C sin el uso de una solución descongelante (Lightfoot y Salamon, 1969*a*; Visser y Salamon, 1973, 1974,*a,b*; Mesaros *et al.*, 1977; Fuki, 1979; citados por Salamon y Maxwell, 1995).

2.2.11 Daño al espermatozoide durante la congelación-descongelación:

Se ha encontrado que el daño es más severo para el espermatozoide de carnero que para el de toro. Después de la congelación rápida y lenta de semen de carnero, la motilidad es mejor preservada que la integridad morfológica del espermatozoide. El plasma y las membranas acrosómicas son más sensibles que el núcleo y pieza media de la célula. La membrana externa es más vulnerable que el acrosoma propiamente dicho y que la membrana interna (Salamon y Maxwell, 1995*b*).

La reducción o cese en la síntesis de ADP y ATP en la mitocondria dañada y un decrecimiento en la actividad proteolítica en el acrosoma, podrían ser otras causas de disturbio en la integridad funcional del espermatozoide después de la congelación y descongelación ((Mann, 1964; Platov, 1968, 1973; Marinov *et al.*, 1980; citados por Salamon y Maxwell, 1995*b*).

El daño criogénico ultraestructural y bioquímico del espermatozoide podría ser responsable de un descenso en su integridad funcional, sobrevivencia *in-vivo* y capacidad fertilizante (Salamon y Maxwell, 1995*b*).

Watson (1995), sugiere que más que ser revividos en el mismo estado en que ellos estaban antes de la congelación, los espermatozoides emergen en un estado asemejándose a la capacitación, habiendo pasado de alguna forma el proceso normal de desarrollo. El proceso de enfriamiento y recalentamiento induce los cambios más que otros eventos asociados con formación de hielo, así las células meramente enfriadas a 0-4°C también exponen dicho efecto (Fuller *et al.*, 1994; Watson, 1996; citados por Maxwell y Watson, 1996).

2.2.12 Métodos de inseminación artificial en ovejas:

Inseminación vaginal:

La fertilidad ha sido variable después de la inseminación vaginal con números relativamente grandes de espermatozoides frescos (31%: Kerton *et al.*, 1984; 35%: Rival *et al.*, 1984; 62-83%: Tervit *et al.*, 1984; 64%: Maxwell y Hewitt, 1986) pero el método no es efectivo cuando se usa semen congelado-descongelado (23%: Tervit *et al.*, 1984; 17%: Maxwell y Hewitt, 1986) (Eppleston y Maxwell, 1993).

Inseminación cervical:

Tasas de concepción de 40-60% se obtienen generalmente después de inseminación cervical con semen fresco (Emmens y Robinson, 1962) y las dosis de espermatozoides usadas permiten inseminar de 20 a 40 ovejas por eyaculado. Cuando el semen congelado es inseminado por vía cervical la fertilidad es inaceptablemente baja, debido a la inhabilidad del espermatozoide descongelado (menos viable) para atravesar la barrera cervical (Mattner *et al.*, 1969; Lightfoot y Salamon, 1970a; Hawk, 1983; citados por Eppleston y Maxwell, 1993).

Existen dos maneras para mejorar la fertilidad del semen congelado inseminado vía cervical. La primera es desarrollar mejores técnicas de inseminación cervical para permitir la deposición del semen avanzado el cérvix o dentro del útero. La segunda es mejorar los procedimientos para congelamiento y descongelamiento del semen y así incrementar la viabilidad y sobrevivencia post-descongelamiento del espermatozoide (Eppleston y Maxwell, 1993).

Eppleston (1992); citado por Eppleston y Maxwell (1993), demostró que la fertilidad incrementaba un 7-12% por cada un centímetro que se avanzaba en profundidad de inseminación cervical. Pese a ésta cercana relación entre profundidad de inseminación y fertilidad el problema radica en que el cérvix puede ser penetrado más de un centímetro solo en una pequeña proporción de ovejas. La profundidad desde la luz cervical a los dos primeros pliegues del mismo parece ser el mayor factor limitante de la penetrabilidad cervical.

Otros estudios mostraron que la penetrabilidad del cérvix se incrementa con la edad de la oveja y es máxima durante el estro temprano (Eppleston y Maxwell, 1993).

Lopyrin y Loginova (1958); citados por Salamon y Maxwell (1995b), reportaron que la penetración del espermatozoide a la porción craneal del cérvix fue más lenta después de una inseminación con semen congelado-descongelado que con semen fresco. Bajos números de espermatozoides se encontraron en los oviductos 3-4 horas después de

la inseminación cervical (Salamon y Lightfoot, 1967; Lightfoot y Salamon, 1970a), o ninguno en el útero y oviductos y muy pocos en el cérvix (Mattner *et al.*, 1969, Salamon y Maxwell, 1995b).

Parecería ser que una proporción de espermatozoides retiene su capacidad fertilizante después de la congelación-descongelación, las mayores causas de baja fertilidad después de inseminación cervical son transporte dificultoso y viabilidad disminuida del espermatozoide en el tracto genital femenino (Salamon y Maxwell, 1995b).

Un factor a ser considerado en inseminación por tiempo con semen congelado-descongelado es que las secreciones cervicales cambian con el avance del estro, y los estadios tardíos se tornan menos favorables para la sobrevivencia y transporte del espermatozoide (Mattner y Braden, 1969; Lopyrin, 1970; Killeen y Moore, 1970a; citados por Salamon y Maxwell, 1995b).

Otros factores que pueden afectar la fertilidad son el momento de inseminación después del cese del tratamiento de sincronización (Souza *et al.*, 1991) y el estrés de las ovejas por un manipuleo agresivo (Cano, 1984) (Salamon y Maxwell, 1995b).

Un método para mejorar la fertilidad después de inseminación cervical, fue la reconcentración del semen descongelado por centrifugación para depositar altos números de espermatozoides en la inseminación. Esto resultó en un incremento de células espermáticas a través del tracto hasta el oviducto, mejoró la fertilización del ovocito y los nacimientos de corderos (Lightfoot y Salamon, 1970b, Salamon y Lightfoot, 1970; Colas y Guérin, 1981; citados por Salamon y Maxwell, 1995). Este método es de baja eficiencia, ya que unas pocas ovejas pueden ser inseminadas con un eyaculado congelado-descongelado (Salamon y Maxwell, 1995b).

En trabajos de Salamon y Lightfoot (1970); y Salamon (1971), la doble inseminación mejoró significativamente los nacimientos de corderos. La magnitud de la respuesta, sin embargo, dependió de la concentración de esperma y del momento de inseminación en relación al estado del estro. Poca ventaja se obtuvo con la segunda inseminación cuando la primera había sido performada entorno a la mitad del celo (Salamon, 1972; citado por Salamon y Maxwell, 1995b).

Los resultados de nacimientos fueron similares cuando iguales números de espermatozoides mótils fueron depositados mediante inseminaciones simples y dobles en el óptimo rango de tiempo (12-25 horas) después de la detección del celo, y el número de espermatozoides mótils inseminado fue más importante que si se realizaban inseminaciones dobles o simples (Salamon, 1977; citado por Salamon y Maxwell, 1995b).

Inseminación uterina:

En la oveja la anatomía compleja del cérvix no permite la inseminación uterina usando una técnica transcervical tan simple como en la vaca (Eppleston y Maxwell, 1993).

Para sobrellevar el problema de la barrera cervical en la oveja, han sido usados métodos de deposición de semen congelado-descongelado en la cavidad intraperitoneal, dentro del útero vía cérvix (inseminación transcervical), o directamente dentro del útero (laparoscopia o laparotomía) (Salamon y Maxwell, 1995b).

La laparotomía, mientras producía una alta tasa de fertilización, conducía a una reducción en la sobrevivencia del embrión (Mattner *et al.*, 1969; Lighthfoot y Salamon, 1970b; Salamon *et al.*, 1979) y además resultaba impráctica sobre bases comerciales (Eppleston y Maxwell, 1993).

Maxwell *et al.* (1984); citado por Eppleston y Maxwell (1993), demostró que la fertilidad usando laparoscopia con semen congelado era equivalente a una inseminación cervical con semen fresco o a una cópula natural sobre un ciclo estral sincronizado.

La introducción de semen por laparoscopia como método de inseminación intrauterina ofrece confianza y resultados predecibles de nacimientos de corderos (Killeen y Caffery, 1982; citado por Salamon y Maxwell, 1995b).

La inseminación intra-uterina permite un decrecimiento en el número de espermatozoides depositados en comparación con la inseminación cervical. Sin embargo debe ser tenido en cuenta el posible detrimento en el transporte del esperma a través de la unión uterotubal si el número de espermatozoides depositados en el útero es excesivamente bajo (Hunter *et al.*, 1982; citado por Salamon y Maxwell, 1995b). Parecería ser que el mínimo número de espermatozoides móviles congelados-descongelados, el cual da satisfactoria fertilidad después de una inseminación intrauterina en ovejas en sincronización de celos, es alrededor de 1 millón (Salamon y Maxwell, 1995b).

Hay relativamente pocos reportes sobre resultados de nacimientos después de una inseminación laparoscópica uterina con semen congelado en ovejas en estro natural (80%, Takenaka *et al.*, 1985; citados por Salamon y Maxwell, 1995b); (42-52%, Azzarini y Valledor, 1987, 1988;). El tiempo de inseminación relativo al comienzo del estro detectado una vez diariamente fue examinado por Reinhold *et al.* (1990); citado por Salamon y Maxwell (1995b), quien obtuvo una mejor tasa de no retorno cuando las ovejas fueron inseminadas en la mañana que en la tarde del día de detección.

La laparoscopia podría interferir con la captura normal de un ovocito y el transporte por el oviducto si se realiza cerca de la ovulación en ovejas superovuladas (Robinson *et al.*, 1989; citado por Salamon y Maxwell, 1995b).

Tanto la inseminación oviductal como intrauterina han sido reportadas como responsables de la baja fertilidad asociada a las ovejas superovuladas con gonadotropinas exógenas (Trounson y Moore, 1974; Armstrong y Evans, 1984; Jabbour y Evans, 1991; citados por Maxwell *et al.*, 1993).

Se sabe que la superovulación interfiere en el transporte del espermatozoides y en la viabilidad cuando se realiza inseminación cervical o vaginal (Evans y Armstrong, 1984; Hawk et al., 1987), y posiblemente también de la tardía (Jabbour y Evans, 1991) o temprana inseminación intrauterina (Robinson et al., 1989; Maxwell et al., 1993). La inseminación tardía podría estar asociada con una fertilización anormal de ovocitos (Killeen y Moore, 1970), o a la falla en las divisiones de los ovocitos fertilizados (Jabbour y Evans, 1991; Maxwell et al., 1993).

El tipo de semen (fresco o congelado) también podría influenciar la fertilidad de las ovejas superovuladas (Armstrong y Evans, 1984; Hunton *et al.*, 1986; citados por Jabbour y Evans, 1991).

La fertilización exitosa y el desarrollo del huevo en ovejas superovuladas son altamente dependientes del momento de inseminación en relación con el retiro de la esponja o el pesario y la presumible ovulación, particularmente cuando se usa semen congelado (Jabbour y Evans, 1991).

El control del momento del estro y ovulación mediante el uso de progestágenos dificulta el transporte del espermatozoides (Quinlivan y Robinson, 1969; citado por Jabbour y Evans, 1991).

Parecería ser que el transporte del espermatozoides congelado desde el útero hacia el ámpula (el sitio más probable de fertilización) fuera perjudicial conduciendo a la inseminación tardía. En la oveja la eficiencia del transporte del espermatozoides disminuye a medida avanza el celo (Killeen y Moore, 1970), y parecería ser que el cérvix, la unión uterotubal, y probablemente el istmo (Quinlivan y Robinson, 1969) estarían involucrados. (Jabbour y Evans, 1991). Claramente el espermatozoides congelado-descongelado es más susceptible que el fresco en la eficiencia del transporte dentro o cerca del oviducto.

2.2.13 Rol de las hormonas para mejorar la fertilidad:

El uso de hormonas exógenas podría ser útil para incrementar la penetración cervical durante la inseminación artificial o para aumentar la contractilidad del tracto

genital, así mejorando el transporte del espermatozoide. Tratamientos con prostaglandinas en ovejas podrían ser generalizados, especialmente desde su adición al semen previo a la I.A. lo cual ha sido reportado como que incrementa el transporte del espermatozoide y la fertilidad (Dimov y Georgiev, 1977) e inyecciones de prostaglandina antes de la inseminación estimulan la actividad contractil del cérvix y útero (Edqvist *et al.*, 1975; Rexroad y Barb, 1975), y podrían mejorar la fertilidad (Mezaros *et al.*, 1980; citados por Eppleston y Maxwell, 1993).

La relaxina inyectada 12 horas antes de la inseminación no tuvo efecto relajante sobre el cérvix y no afectó la profundidad de la inseminación (Salamon y Lightfoot, 1970). No hay datos experimentales para indicar si la relaxina puede afectar la profundidad de inseminación en ovejas.

La oxitocina estimuló la actividad contractil del cérvix y útero *in-vivo* e *in-vitro* (Lightfoot, 1969; Edqvist *et al.*, 1975b), dilató el cérvix (Khalifa *et al.*, 1992) y mejoró el transporte del espermatozoide después de la cópula (Thibault y Wintenberger-Torres, 1967; Lang y Oh, 1970), pero no después de la inseminación con semen congelado (Lightfoot y Salamon, 1970a). Menger (1980); citado por Salamon y Maxwell (1995b), sin embargo reportó que la oxitocina mejoraba la fertilidad del semen congelado-descongelado.

La PGE1, PGE2 y PGF2 α estimularon la actividad contractil del cérvix y útero *in-vitro* e *in-vivo* (Rexroad y Barb, 1975; Edqvist *et al.*, 1975b), y la suplementación del semen con PGE1 y PGF2 α antes de la congelación también mejoró el transporte del espermatozoide en el tracto genital femenino (Edqvist *et al.*, 1975a; Gustafsson *et al.*, 1977; Varnavskij, 1981; citados por Salamon y Maxwell, 1995b). Sin embargo, la adición de PG alrededor de 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ al semen antes de la congelación causó un descenso en la motilidad post-descongelación del espermatozoide (Memon *et al.*, 1984; citados por Salamon y Maxwell, 1995b). La fertilidad fue mejorada después de la suplementación de PGs al semen fresco diluido (Dimov y Georgiev, 1977; Gökçen *et al.*, 1985) pero no para semen almacenado en frío (Salamon *et al.*, 1979; El-Gaafary *et al.*, 1986). La PG mejoró los nacimientos de corderos cuando se agregó al semen descongelado pero no cuando se usó antes de la congelación (Varnavskij, 1981; citado por Salamon y Maxwell, 1995b). Otros investigadores que agregaron PGF2 α al semen descongelado reportaron mejoras en la motilidad del espermatozoide (Rodríguez *et al.*, 1986; Anel *et al.*, 1988) y en los nacimientos (Zhilcov *et al.*, 1974; Gustafsson *et al.*, 1975; Davidenko *et al.*, 1978; citados por Salamon y Maxwell, 1995b).

Inyecciones con PGF2 α a ovejas antes de la inseminación con semen congelado también mejoró los resultados de nacimientos de corderos (Mesáros *et al.*, 1980). Por otro lado el transporte del espermatozoide se reduce cuando PGF2 α es usada en sincronización de celos (Evans y Armstrong, 1984) (Salamon y Maxwell, 1995b).

2.2.14 Efectos del plasma seminal en el medio de dilución:

El plasma seminal provee un medio para la motilidad del esperma después de la eyaculación, y muchos de sus constituyentes se sabe que asisten al esperma en la fertilización del ovocito (Vishwanath y Shannon, 1997).

Existe una relativamente fuerte interacción entre la membrana del espermatozoide y las proteínas del plasma seminal (Vierula y Rajaniemi, 1980; Voglmayr et al., 1980; Voglmayr, 1987; citados por Vishwanath y Shannon, 1997).

Al plasma seminal se le atribuye una significativa actividad anti-bacterial (Taylor y Morgan, 1952; Shannon *et al.*, 1974, 1975; Theil y Scheit, 1983a; citados por Vishwanath y Shannon, 1997). Esta actividad es efectiva para un amplio rango de organismos y parecería tener un rol en la prevención de infecciones del tracto reproductivo masculino (Fair *et al.*, 1973). Esas proteínas anti-bacteriales han sido implicadas también como factores anti-fertilidad mediante la inhibición de la motilidad del esperma, capacitación, reacción acrosómica y penetración del ovocito (Vishwanath y Shannon, 1997).

La inclusión de yema de huevo en un medio de dilución dio alguna protección contra el efecto tóxico del plasma seminal (Shannon y Curson, 1972b). De hecho, una fracción catiónica de yema de huevo fue mucho más protectora contra los efectos tóxicos del plasma comparada con la yema de huevo entera en cuanto a motilidad y fertilidad del esperma (Vishwanath y Shannon, 1997).

2.2.15 Mortalidad embrionaria:

La mayoría de los investigadores han reportado un incremento en la mortalidad embrionaria a medida que aumenta la duración del almacenamiento líquido del semen de carnero (Maxwell y Salamon, 1993).

El retorno tardío al servicio (1.5 a 2 meses) también ha sido reportado después de una inseminación con semen congelado, en la mayoría de los casos indicando mortalidad embrionaria (Morozov, 1964; Milovanov y Sokolovkaja, 1964; citados por Salamon y Maxwell, 1995). Parecería ser que la mortalidad embrionaria es un factor adicional que contribuye a la baja fertilidad después de la inseminación cervical con semen congelado, aparte del transporte y viabilidad del espermatozoide. Sin embargo esto podría variar dependiendo del momento y método de inseminación (Salamon y Maxwell, 1995b).

La condición de los gametos en el momento de la fertilización se cree que afecta el desarrollo del embrión, en muchas instancias el almacenamiento prolongado del espermatozoides tanto *in-vivo* como *in-vitro* afectó el desarrollo embrionario (Vishwanath y Shannon, 1997).

2.2.16 Efecto del carnero y fotoperíodo sobre la congelabilidad del semen:

Parecería ser que el tipo de crianza del carnero, condiciones geográficas o climáticas son importantes para la congelabilidad del semen.

El efecto benéfico del fotoperíodo decreciente sobre la congelabilidad del semen (evaluado *in-vitro*) ha sido reportado por Colas y Brice (1976), así como Fiser y Batra, (1984) y Fiser y Fairfull (1983, 1986); citados por Salamon y Maxwell, (1995b).

Las diferencias entre carneros podrían ser tanto genéticas como ambientales, mientras que las diferencias en el eyaculado son probablemente debidas a la nutrición, manejo y frecuencia de eyaculación (Maxwell, 1980; Curnock *et al.*, 1984; Maxwell, 1986b; Butler y Maxwell, 1988; Eppleston y Maxwell, 1991; Quintana Casares *et al.*, 1991a, b; Windsor, 1992; Edward *et al.*, 1992; citados por Salamon y Maxwell, 1995b).

3. MATERIALES Y METODOS:

3.1- UBICACIÓN:

El experimento para la evaluación del transporte espermático fue realizado en el establecimiento “El Rincón” ubicado en la 9ª Sección Judicial del departamento de Lavalleja, paraje Paso del Rey, durante la última quincena del mes de marzo y la primera de abril del 2000. Dicho establecimiento se sitúa a 33^G 45 grados de latitud sur y 54^G 52 de longitud.

3.2- ANIMALES:

Se trabajó con hembras y machos de la raza ovina Corriedale, habiendo las hembras completado la dentición y siendo clasificadas en condición corporal mediante escala Jeffries (1961). Todos los animales pertenecieron al mismo rebaño, recibieron idénticos manejos sanitarios y fueron alimentados a campo natural en una dotación de 0.8 U.G./ha. Se distribuyeron al azar de acuerdo a los distintos tratamientos

3.3- DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS:

Se realizaron dos Ensayos que permitieron efectuar los diferentes tratamientos. Estos posibilitaron evaluar el transporte del espermatozoides luego de I.A. cervical con:

- Semen fresco diluido en leche descremada al 10% (T 1).
- Semen conservado a 4-5 °C durante 24 h., con dos momentos diferentes de inseminación (46 y 50 horas de retiradas las esponjas) (T 2 y T 3).
- Semen fresco diluido en leche descremada al 10% con 20 µg. de prostaglandina (ídem anterior) (T 4).
- Semen conservado a 4-5 °C durante 24 h. (T 5) con el agregado de un espasmogénico (20 µg. de prostaglandina :Glandinex, Laboratorio Universal) adicionadas en el momento de la I.A. (T 6).

3.3.1- Ensayo I:

Integraron el ensayo 51 ovejas que fueron sincronizadas con esponjas intravaginales de MAP (Laboratorio Universal, 60 mg de Medroxiprogesterona), insertas durante 12 días. La condición corporal promedio del lote fue de 3, asignadas al azar dentro de cada tratamiento. Del total de hembras, 15 ovejas se inseminaron con semen fresco (grupo testigo), 12 ovejas con semen conservado durante 24 horas e inseminadas

a las 46 horas de retiradas las esponjas, 12 ovejas con igual tratamiento que el grupo anterior pero inseminadas a las 50 horas de retiradas las esponjas, y las 12 restantes con semen fresco con Pg F2 α (CUADRO I).

CUADRO I. Tratamientos realizados en el ENSAYO I.

Tratamiento- Momento de la colecta (horas post- inseminación)	Tipo de semen	Momento de inseminación (horas de retirada la esponja)	Número de ovejas
T1- 2 horas	Semen fresco	48	5
T1- 6 horas	Semen fresco	48	5
T1- 24 horas	Semen fresco	48	5
T2- 2 horas	Semen conservado 24 horas	46	4
T2- 6 horas	Semen conservado 24 horas	46	4
T2- 24 horas	Semen conservado 24 horas	46	4
T3- 2 horas	Semen conservado 24 horas	50	4
T3- 6 horas	Semen conservado 24 horas	50	4
T3- 24 horas	Semen conservado 24 horas	50	4
T4- 2 horas	Semen fresco + PgF2α	48	4
T4- 6 horas	Semen fresco + PgF2α	48	4
T4- 24 horas	Semen fresco + PgF2α	48	4

En este ensayo a todas las hembras se les practicó una histerectomía, según se describe en el ítem 3.5.

Como uno de los objetivos del presente trabajo fue comparar distintos momentos de inseminación dentro del celo (46 vs. 50 horas de retiradas las esponjas), de acuerdo a los resultados previamente obtenidos por Fernández Abella *et al.* (2000), se realizó la extracción de las esponjas en diferentes momentos para mantener constantes las horas de conservación del semen. Esto fue así designado a fin de poder realizar la inseminación con semen conservado 24 horas en ambos grupos.

3.3.2- Ensayo II:

Se realizó sobre 21 ovejas sincronizadas con esponjas de MAP (Laboratorio Sta. Elena, 60 mg. de Medroxiprogesterona) con exactamente la misma duración del tratamiento que en el Ensayo I. La clasificación en condición corporal de éste grupo resultó en un valor promedio de 3.25. En éste Ensayo se inseminaron 12 hembras con semen conservado 24 horas y en el mismo momento 9 hembras con el mismo semen con el agregado de PgF2 α (CUADRO II). Ambos lotes fueron inseminados 48 horas después de retirar las esponjas.

Para la extracción del útero las hembras fueron sacrificadas.

CUADRO II. Tratamientos realizados en el Ensayo II.

Tratamiento- Momento de la colecta (horas post- inseminación)	Tipo de semen	Momento de inseminación (horas de retirada la esponja)	Número de ovejas
T5- 2 horas	Semen conservado 24 horas	48	4
T5- 6 horas	Semen conservado 24 horas	48	4
T5- 24 horas	Semen conservado 24 horas	48	4
T6- 2 horas	Semen conservado 24 horas + PgF2α	48	3
T6- 6 horas	Semen conservado 24 horas + PgF2α	48	3
T6- 24 horas	Semen conservado 24 horas + PgF2α	48	3

3.4- MANEJO DEL SEMEN:

La extracción de semen se realizó mediante vagina artificial, con estimulación del macho por la presencia de una hembra en celo. Inmediatamente luego de cada extracción se evaluó el semen (pruebas macroscópicas: movilidad en masa, color, volumen). La concentración del mismo se comprobó mediante fotocolorímetro previamente calibrado ($r^2=0.97$). Posteriormente se realizó la dilución del semen en todos los casos una relación de 1.5:1, realizado la inseminación con igual dosis espermática (120:).

El diluyente utilizado para la conservación de semen fue Fiser modificado (Fernández Abella *et al.*, 1998). El mismo se prepara en base a 100 ml de leche descremada al 11% de dilución, 5.8 mM de citrato trisódico, 21 % (v/v) de yema de huevo y 100 mg de antibiótico (penicilina-estrepto). El pH fue de 7.30, mientras que al agregar Pg F2 α el pH del diluyente disminuye a 6.88.

En la I.A. fueron depositados en el cérvix de las hembras 120 millones de espermatozoides totales. El método de inseminación artificial consistió en depositar el semen en el segmento del canal cervical más próximo a la vagina, con la ayuda de un vaginoscopio.

3.5- MANIPULACIÓN DEL TRACTO GENITAL

Para evaluar el transporte del espermatozoides después de la inseminación, el útero y los ovarios fueron obtenidos por histerectomía o a través del sacrificio de las ovejas, Ensayos I y II respectivamente.

Para realizar la ovariohisterectomía las ovejas fueron sometidas a anestesia local (Lidocaína, 15 cc), según técnica descrita por Roberts (1979). La misma se basa en la extracción del órgano mediante un corte a la altura de la unión de vagina y cérvix, teniendo cuidado al exteriorizar el útero, para que no se desgarre un vaso con la consiguiente hemorragia. Se deben ligar firmemente las arterias ovariana, uterina media y uterina caudal. Se colocan pinzas a través del cuerpo y cérvix uterino, después de incidir el ligamento ancho y de estar sueltos los ovarios y el útero. Se administró antibiótico (Terramicina, 10 cc) para prevenir la contaminación abdominal.

En ambos Ensayos se realizó en cada órgano la lectura de las estructuras ováricas (folículos luteinizados, folículos preovulatorios, cuerpos lúteos) por apreciación visual.

3.6- DESCRIPCIÓN DEL FLUSHING:

Luego de obtenido el tracto genital (no más de 20 minutos), el útero y los oviductos fueron lavados (flushing) con una solución de fosfato buffer (PBS) de pH=7.0 según técnica descrita por Hunter *et al.* (1980). La solución obtenida fue centrifugada lentamente (800 r.p.m.) durante 20 minutos para su posterior lectura. En cada útero se separó el cérvix mediante corte transversal para el posterior lavado del canal cervical con no menos de 10 ml de PBS. Seguidamente se lavaron los cuernos uterinos inyectando con una jeringa el líquido de lavado a la altura de la unión del cuerno con el oviducto, cada uno de ellos se lavó con no menos de 10 ml de PBS; inmediatamente después se realizó un masaje del cuerno para ayudar a la circulación del líquido y su siguiente colecta en el tubo de ensayo. Para los oviductos se procedió de la misma manera, inyectando en la unión útero-tubal la solución buffer y recogiendo por el infundíbulo en un tubo de ensayo, utilizando 3 ml del buffer por oviducto. Luego de cada lavado, recogida la solución en distintos tubos de ensayo, se procedió al centrifugado de los mismos. Se mantuvo la solución de lavado siempre a una temperatura de 36-40 °C.

3.7- RECUENTO DE ESPERMATOZOIDES:

Después del centrifugado de los tubos de ensayo se procedió al recuento de los espermatozoides por cámara de Neubauer. Este método consiste en aspirar en una pipeta una solución de semen y cargar la cámara por capilaridad (impidiendo que queden glóbulos de aire o zonas sin líquido). Se realizó la lectura sobre seis alícuotas de la parte inferior de los tubos, luego de retirar el sobrenadante (soluciones de 0.5 a 1.0 cc).

3.8- ESTADÍSTICA:

Los resultados fueron analizados, previa transformación logarítmica, a través de un análisis de varianza utilizando el Paquete Estadístico SAS, versión 6.12. Se determinó un nivel de significación de 12 %. Los contrastes entre medias fueron realizados a través de la prueba de diferencia mínima significativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSION:

4.1- RESULTADOS-ENSAYO I:

De los 120 millones de espermatozoides depositados en el cuello uterino a las 2 horas de la inseminación artificial, un promedio de 16 millones fue colectado en todo el tracto genital cuando la I.A. se realizó con semen fresco (CUADRO III).

En el cérvix fueron recuperados el 95 % del total. En los restantes tratamientos el número de espermatozoides colectados fue significativamente inferior ($P < 0.001$).

El número de células espermáticas obtenidas en el cérvix disminuyó marcadamente desde la hora 2 a la hora 24. El descenso fue mayor cuando la inseminación fue realizada con semen fresco (Cuadro III). El número de espermatozoides presentes en el cérvix a las 2 horas fue un 50, 35 y 20% para los tratamientos T1, T2, y T3, no observándose diferencias significativas debido a la alta variabilidad de los datos ($CV > 35\%$).

Cuando se adicionó $PgF2\alpha$ al semen fresco (T4) la caída fue más brusca, no encontrándose diferencias en el cuello uterino con los otros tratamientos a las 24 horas de realizada la inseminación ($P > 0.12$).

A nivel uterino la población espermática fue muy superior cuando se trabajó con semen fresco ($P < 0.0001$), existiendo un menor número de células espermáticas cuando se realizó la I.A. con semen conservado a las 50 h. con respecto a las 46 h. de retiradas las esponjas de sincronización (22080 vs. 3120 espermatozoides; $P < 0.01$). A las 6 horas de la I.A. aún se mantienen las diferencias de espermatozoides cuando se inseminó con semen fresco respecto a los otros tratamientos ($P < 0.12$), manteniéndose esa tendencia a las 24 horas.

La población espermática recuperada en el oviducto fue similar en las distintas horas, no existiendo diferencias cuantitativas.

CUADRO III. Valores promedio de espermatozoides recuperados para los distintos tratamientos y porciones del tracto reproductivo femenino (Ensayo I).

	<i>Cérvix (esp. x 10⁶)</i>			<i>Útero(esp. x 10³)</i>			<i>Oviductos(esp. x 10³)</i>		
	Cx2h	Cx6h	Cx24h	Ut2h	Ut6h	Ut24h	Ov2h	Ov6h	Ov24h
T1	15.53***a	7.13	0.86	85.33a	44.33●●a	15	9.3	12.0	7.6
T2	5.49 b	3.16	0.83	22.08b	8.54 b	2.92	6.6	3.3	4.1
T3	3.11 b	3.66	2	3.12 c	8.33 b	7.94	5.0	5.8	7.5
T4	5.83 b	0.66	0	20.83 b	14.16 b	2.5	11.7	8.3	4.2

a vs b: *** P<0.001 ●● P= 0.12

Ut 2h: a vs b: P<0.05; a vs c: P<0.0001; b vs c: P<0.01

La cantidad espermática a nivel de cérvix, observada 2 horas post-inseminación está positivamente correlacionada con los valores espermáticos en el útero a las 2 horas ($r= 0.64$; $P< 0.05$) y a las 6 horas ($r= 0.71$; $P< 0.01$); no observándose ninguna asociación con la cantidad de espermatozoides que alcanza el oviducto.

El porcentaje de ovejas que habían alcanzado la ovulación a las distintas horas del flushing (lavados) y para los distintos tratamientos fue aumentando con el transcurrir del tiempo (CUADRO IV), no obstante en el tratamiento 3 (C50h.) a las 2 horas, el total de hembras ya había ovulado. En el tratamiento 1 y 2 no se alcanzó el 100% de animales con cuerpo lúteo presente a las 24 h.

La población de folículos reclutados fluctuó entre 1.0 y 2.5 por animal, no existiendo diferencias significativas entre tratamientos ($P> 0.12$).

CUADRO IV. Estructuras ováricas (Ensayo I).

Horas	T1		T2		T3		T4	
	F	C.L.	F	C.L.	F	C.L.	F	C.L.
2	1.6	0.4	0.75	0.25	0.75	1.0	0.50	0.50
6	1.2	0.4	1.25	0.25	1.75	0.25	2.0	0.50
24	1.6	0.6	0.75	0.5	-	1.0	-	1.0

4.2- RESULTADOS-ENSAYO II:

El agregado de PgF2 α al semen conservado durante 24 h.(T6) determinó una reducción marcada de espermatozoides, colectados en las distintas partes del aparato reproductor. Esto se observó especialmente en el cérvix a las 2 horas, en el útero a las distintas horas analizadas y en el oviducto a las 24 h post-inseminación (CUADRO V).

CUADRO V. Valores promedio de espermatozoides recuperados para los distintos tratamientos y porciones del tracto reproductivo femenino (Ensayo II).

	<i>Cérvix(esp x 106)</i>			<i>Útero(esp x 103)</i>			<i>Oviductos(esp x 103)</i>		
	Cx2	Cx6	Cx24	Ut2	Ut6	Ut24	Ov2	Ov6	Ov24
T5	14.37*	0.58	0.33	30.8	6.66*	8.33	7.49●	6.66	8.33●
T6	3.33	0.22	0.33	5.55	3.33	1.66	3.33	5.55	3.33

* P< 0.05 ● P< 0.10

El número de células espermáticas colectadas en el cérvix a las 2 horas post-inseminación está correlacionado positivamente con la cantidad de espermatozoides presentes en el útero a las 2 ($r= 0.68$; $P < 0.10$), 6 ($r= 0.64$; $P < 0.10$) y 24 horas ($r= 0.80$; $P < 0.05$) post-inseminación.

Las poblaciones espermáticas recuperadas en el oviducto a las 2 y 24 horas están altamente correlacionadas con los niveles espermáticos alcanzados en el cuello uterino a las 2 horas de la inseminación ($r= 0.80$; $r=0.89$; respectivamente, $P < 0.01$).

En este Ensayo el reclutamiento folicular fue bajo (1.0-1.3), observándose un mayor porcentaje de hembras que presentaron un cuerpo lúteo a las 24 h. (CUADRO VI).

CUADRO VI. Estructuras ováricas (Ensayo II).

Horas	T5		T6	
	F	C.L.	F	C.L.
2	1.00	-	1.00	-
6	0.75	-	0.66	0.33
24	0.75	0.50	0.50	0.50

4.3. DISCUSION:

El número de espermatozoides (120 millones) y el volumen (0,04 cc) de la dosis de semen utilizados, fueron determinados según trabajos anteriores donde se obtuvieron buenos porcentajes de fertilidad (Fernández Abella y Villegas, 1992). La mayoría de dicha dosis espermática depositada en el cérvix durante la inseminación, se pierde a las 2 horas de la misma. Estudios en el extranjero han demostrado que el 85- 90 % del semen depositado no es encontrado en el tracto reproductivo femenino debido a que la mayoría se pierde por expulsión vía vaginal (Dobrowolski y Hafez, 1970; El Banna y Hafez, 1970; Lighthfoot y Restall, 1971). Asimismo, gran proporción del esperma es removida por fagocitosis, fenómeno que se incrementa al transcurrir el tiempo (Bedford, 1965; Overstreet *et al.*, 1978) y al aumentar el volumen de la dosis. Esto último ha sido verificado en la especie bovina (Preval *et al.*, 1998). Coincidentemente, en nuestro trabajo experimental el 87 % de los espermatozoides depositados no fueron recuperados, observándose una pérdida de los espermatozoides recobrados con el transcurrir del tiempo. Esto se explicaría por los fenómenos de fagocitosis y de disminución de la motilidad de los espermatozoides. Esta disminución es consecuencia de la peroxidación lipídica o estrés oxidativo producido por los leucocitos principalmente cuando existe abundante cantidad de ácido graso saturado en el plasma seminal (Jones *et al.* 1979), o cuando el volumen de la dosis es elevado. En el presente trabajo experimental la dosis y la relación de dilución fue siempre la misma, por lo que de haber existido efectos negativos del volumen de dosis los mismos fueron similares en todos los tratamientos.

Al utilizar semen fresco la población espermática fue mayor en el cérvix y el útero a las 2 horas post-inseminación. Esto indica una mayor velocidad de pasaje espermática coincidiendo con lo observado por Brückner y Kampler (1984), quienes compararon la velocidad de transporte del semen fresco *versus* refrigerado, utilizando espermatozoides marcados con radiactividad.

El agregado de un espasmogénico (PgF2 α) en el semen fresco determinó una caída brusca del número de espermatozoides, lo que indica que no mejora el transporte espermático; contradiciendo algunos resultados reportados en la literatura extranjera (Hawk, 1983; Dimov y Georgiev, 1977) así como la nacional (Castrillejo y Rodríguez, 1981), donde se ha mejorado la fertilidad con la utilización de dicha hormona. Hipotéticamente, el agregado de tal espasmogénico mejora la calidad de los espermatozoides seleccionados, al destruir los espermatozoides menos viables. Esta especulación se puede realizar en base a que la cantidad de espermatozoides que alcanzaron el oviducto a las 24 horas fue suficiente como para producir la fertilización, de acuerdo a lo reportado por la literatura como se discute más adelante en el texto. Asimismo, los resultados de Castrillejo y Rodríguez (1981) en nuestro país potencializan dicha aseveración, ya que no lograron mejorar la fertilidad del semen cuando la calidad de los eyaculados era baja.

En la presente tesis el agregado de Prostaglandina previo a la I.A. en semen conservado durante 24 horas a 5 °C, determinó una reducción marcada de los espermatozoides, coincidentemente con los resultados obtenidos por Salamon *et al.* (1979) y El Gaarafy *et al.* (1986).

La población espermática recuperada en el oviducto fue similar en los tratamientos realizados en el Ensayo I. En cambio en el Ensayo II los valores fueron muy superiores cuando se trabajó con semen conservado sin el agregado de PgF2 α . Esto indica como ya se mencionó una reducción del transporte espermático con el agregado de dicha hormona.

Las diferencias en el número espermático entre Ensayos pueden explicarse porque los animales del Ensayo I, alcanzaron la ovulación en un corto plazo. En efecto, las ovejas utilizadas en tal Ensayo fueron pasibles de un “efecto macho” al estar pastoreando un potrero contiguo con presencia de machos. Es conocido que a una distancia menor de 500 metros dicho efecto se verifica, adelantando el mismo el pico de LH y la ovulación (Lindsay *et al.*, 1975; Cognié *et al.*, 1984). Esto determinó que las ovejas fueran inseminadas durante un momento cercano a la ovulación. Es sabido del efecto negativo de la inseminación tardía sobre el transporte espermático, especialmente con el semen conservado fresco y/o congelado (Quinlivan y Robinson, 1969; Killeen y Moore, 1970; Jabbour y Evans, 1991; Eppleston y Maxwell, 1993).

Las cantidades de espermatozoides recuperados en el oviducto a las 24 horas son similares a las citadas en la literatura (5000 espermatozoides; Hawk, 1983; Quinlivan y Robinson, 1969).

El número de espermatozoides en el cérvix 2 horas post-inseminación, mostró una alta correlación con el número de células espermáticas en útero a las 2 y 6 horas y una muy alta asociación con el número de espermatozoides en el oviducto a las 2 y 24 horas de la I.A. Esto último se verificó solo en el Ensayo II, pudiendo explicarse por lo mencionado anteriormente sobre el adelanto de las ovulaciones en el Ensayo I. Esto concuerda con lo observado por Crocker *et al.* (1975) y Hawk y Conley (1975), quienes encontraron una alta correlación entre el número de espermatozoides en el istmo oviductal en el momento de la fertilización, y el número de aquellos observados en el cérvix 2 horas después del apareamiento.

Según Toutain *et al.* (1983) cuando la cópula se realiza en el momento periovulatorio la tasa de concepción es baja, quizás por ausencia de selección del esperma y/o un tiempo de permanencia en el cérvix y útero para su capacitación. Estos autores sugieren que la motilidad útero-cervical durante el estro tiene un rol en la capacidad de selección del esperma. Asimismo, es sabido que la cópula favorece las

contracciones uterinas respecto a la inseminación artificial (Prud'homme y Pelé, 1984), por lo que en parte se pueden explicar las diferencias observadas entre citas de la literatura, aún utilizando altas dosis espermáticas.

El reclutamiento folicular fue mayor en el Ensayo II, no pudiéndose explicar esto por cambios en el fotoperíodo; ya que el intervalo entre ensayos fue de tan solo quince días. Este mayor reclutamiento puede explicarse por el efecto macho producido en el Ensayo I, ya que es bien conocido que dicho efecto aumenta el reclutamiento (Cognié *et al.*, 1980; Pearce *et al.*, 1984).

El adelantar la I.A. con semen conservado (46 vs. 50 horas) mejora el número de espermatozoides presentes en el útero a las 2 horas post-inseminación, lo que podría explicar en parte resultados obtenidos en el país donde la fertilidad fue significativamente superior (52 vs. 24 %, 46 y 50 horas respectivamente; Fernández Abella *et al.*, 2000).

5. CONCLUSIONES:

Los resultados de la presente tesis permiten afirmar que bajo nuestras condiciones de Ensayo el semen fresco presenta una mayor velocidad de transporte, verificado por una población superior de células espermáticas a nivel del tracto genital, principalmente en el cérvix a las 2 horas después de la inseminación artificial.

El agregado de PgF2 α reduce los niveles espermáticos observados en el cérvix y en el útero, cuando es utilizado en semen fresco y en conservado 24 horas. Asimismo el número de espermatozoides a nivel del oviducto 24 horas post-inseminación es inferior cuando se utiliza esta hormona con semen conservado.

Al no existir en la literatura trabajos que hayan evaluado éstos efectos, el incremento de la fertilidad por el agregado de PgF2 α no estaría explicado por una mejora en el transporte espermático, sino por otros efectos hoy desconocidos, presumiblemente por una selección de espermatozoides de mejor calidad.

La mejora de la fertilidad cuando se realiza la inseminación con semen conservado adelantando el momento de la inseminación (46 vs. 50 horas), en parte puede estar dada por el incremento de la población de células espermáticas en el útero 2 horas después de la inseminación.

Para futuros estudios en condiciones similares a las del presente trabajo, la sola medición del número de espermatozoides en el cérvix 2 horas después de la inseminación artificial, explicaría posibles diferencias en el transporte espermático debidas a los distintos tratamientos. Esto es consecuencia de la alta correlación con los niveles espermáticos en el resto del tracto genital, y más específicamente con la cantidad de espermatozoides en el oviducto 24 horas después de la inseminación.

6. RESUMEN:

En el otoño se estudió el transporte espermático a través de dos ensayos utilizándose un total de 72 ovejas de la raza Corriedale, con el fin de evaluar los efectos de la conservación del semen a 4-5 °C durante 24 horas, y el uso de PgF2 α . En el Ensayo I se realizaron cuatro tratamientos: T1- semen fresco diluido en leche descremada al 10 %, T2- semen conservado a 4-5 °C realizando la inseminación 46 horas de retiradas las esponjas, T3- ídem al anterior pero cambiando el momento de inseminación (50 horas), T4- semen fresco diluido en leche descremada con el agregado de 20 μ g de PgF2 α . En el segundo Ensayo se efectuaron dos tratamientos: T5- semen conservado a 4-5 °C durante 24 horas y T6- ídem al anterior con el agregado de 20 μ g de PgF2 α adicionadas en el momento de la inseminación. Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas de 60 mg. de MAP y todas fueron inseminadas con una dosis de 0.4 cc la cual contenía un total de 120 millones de espermatozoides en una relación de dilución de 1.5:1. Para evaluar el transporte espermático el útero y los ovarios fueron obtenidos por histerectomía o a través del sacrificio de las ovejas, Ensayos I y II respectivamente, a las 2, 6 y 24 horas. Los resultados fueron analizados, previa transformación logarítmica, a través de un ANAVA.

De los 120 millones de espermatozoides depositados en el cuello uterino solo pudieron ser recuperados el 13 % a las dos horas cuando se utilizó semen fresco; disminuyendo marcadamente con el transcurrir del tiempo. Cuando se inseminó con semen conservado, los valores espermáticos colectados fueron significativamente inferiores. Dichas diferencias mostraron un mayor nivel de significación a las 24 horas post-inseminación en el cérvix y útero. El agregado de PgF2 α en el semen fresco y conservado redujo los niveles espermáticos tanto en el cérvix como en el útero; siendo el número de espermatozoides en el oviducto, al día siguiente de la inseminación, inferior cuando se utilizaba con semen conservado. El número de espermatozoides en el cérvix a las 2 horas mostró una alta correlación con el número de células espermáticas en el útero a las 2 y 6 horas y una muy alta asociación con el valor encontrado en el oviducto a las 2 y 24 horas. El adelanto de la inseminación utilizando semen conservado (T2) mejoró el número de espermatozoides presentes en el útero a las 2 horas. Los resultados obtenidos muestran una mayor velocidad de transporte cuando se realiza la inseminación con semen fresco. Asimismo, indican que de existir una mejora en la fertilidad con el agregado de PgF2 α en el semen, no estaría explicada por un incremento en el transporte espermático.

En futuros estudios la técnica utilizada podría simplificarse considerándose solo la medición del número de espermatozoides en el cérvix a las 2 horas, dada su alta correlación con los niveles espermáticos en el resto del tracto genital y más específicamente con la cantidad de espermatozoides en el oviducto a las 24 horas.

Palabras clave: ovinos, inseminación artificial, semen conservado, transporte espermático.

7. SUMMARY:

During autumn 72 Corriedale ewes were used to evaluate the effects of semen conservation at 4-5 °C during 24 hours and the use of PgF2 α on sperm transport. The females were divided into two Experiments (six treatments) according to the semen and time of cervical insemination. In Experiment I the ewes were divided at random in 4 treatments: T1- fresh semen diluted in skim milk; T2- liquid storage semen at 4-5 °C performing the insemination 46 hours after sponge removal; T3- same to T2 changing the time of insemination (50 hours) ; T4-fresh semen diluted in skim milk adding 20 μ g of PgF2 α . In Experiment II two treatments were achieved: T5- liquid storage semen at 4-5 °C during 24 hours, and T6-same to T5 plus the previous adding 20 μ g of PgF2 α at the insemination time. Ewes were synchronised with 60 mg -MAP-sponges and were inseminated with 120 million spermatozoa (dose: 0.4 cc, dilution rate: 1.5:1). In order to evaluate the sperm transport, uterus and ovaries were removed by hysterectomy or through ewes slaughter, Experiments I and II respectively, at 2, 6 and 24 hours after insemination. The results were analysed after logarithmic transformation by ANAVA. From 120 million spermatozoa inoculated in the cervix only a 13 % were recovered at 2 hours when fresh semen was used, decreasing notoriously in the lapse of time. When the insemination were achieved with conserved semen, the number of sperm cells collected were significantly lower. These differences showed a greater level of statistical signification at 24 hours post-insemination in cervix and uterus. The addition of PgF2 α in fresh and liquid storage semen reduced the spermatozoa population in cervix and uterus, having a lower number of spermatozoa in the oviduct the day after insemination when storage semen was used. The number of spermatozoa in cervix within 2 hours showed a high relationship with the number of sperm cells in uterus at 2 and 6 hours and a very high association with the data found in the oviduct at 2 and 24 hours. Advance of the time insemination using storage semen (T2) improved the number of spermatozoa in the uterus at 2 hours. The results obtained shows a greater sperm transport when the insemination is achieved with fresh semen. Moreover, it shows that in case any fertility improvement occurs with the addition of PgF2 α in semen, it would not be explained by an increase in sperm transport. In future studies the method used would be simplified by considering only the measurement of the number of spermatozoa in the cervix at 2 hours, because of it high correlation with the sperm population in the rest of the genital tract and, more specifically, with the amount of spermatozoa in oviduct at 24 hours.

Key words: sheep, artificial insemination, liquid storage semen, sperm transport.

8. BIBLIOGRAFIA:

- 1- Adams, N.R. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. Division of Animal Production, Australia. 73(5):1509-15.
- 2- Azzarini, M. y Valledor, F. (1987). Inseminación intra-uterina con semen congelado en ovejas. Boletín Técnico Ovinos y Lanas (Sul) 16:7-14.
- 3- ----- (1988). Inseminación intra-uterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural. Prod. Ovina (SUL) 1:1-18.
- 4- Bedford, J.M. (1983). Significance of the Need for Sperm Capacitation Before Fertilization in Eutherian Mammals. Biology of Reproduction 28:108-20.
- 5- Drobnis, E.Z.; Overstreet, J.W. (1992). Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. Oxford Rev. 141-45.
- 6- Eppleston, J.; Maxwell, W.M.C. (1993). Attempts to Improve the Fertility of Frozen Ram Semen Inseminated into the Cervix. Wool Tech. Sheep Bred. 41:291-302.
- 7- Fernandez-Abella, D., Preve, M.O. and Villegas, N. (2000). Effects of time of insemination and dilution rate of liquid storage semen on sheep fertility. Sub. Theriogenology.
- 8- Garcia-Villar, R.; Schams, D.; Alvinere, M.; Laurenti, M.P.; Toutain, P.L. (1985). Activity of the genital tract and plasma levels of oxytocin and cortisol at the time of mating in the ewe. J. Endocrinol. 105(3):323-9.
- 9- Hansen, P.J. (1995). Interactions between the immune system and the ruminant conceptus. J. Reprod.-Fertil.-Suppl. 49:1013-20.
- 10- Hawk, H.W. (1983). Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. J. Dairy Sci. 66: 2645-2660.
- 11- ----- Conley, H.; Cooper, B.S. (1978). Number of sperm in the oviducts, uterus, and cervix of the mated ewe as affected by exogenous estradiol. Journal Animal Science 46(5):1300-8.
- 12- Hunter, R.H.; Nichol, R; Crabtree, S.M. (1980). Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. Reprod. Nutr. Develop. 20 (6), 1869-1875.
- 13- ----- Barwise, L.; King, R. (1982). Sperm transport, storage and release in the

sheep oviduct in relation to the time of ovulation. *British Vet. Journal* 138: 225-232.

14- -----. Nichol, R. (1993). Rate of establishment of a fertilising population of spermatozoa in the sheep cervix after a single mating at the outset of oestrus. *Journal Exp. Zool.* 266(2):168-71.

15- Jabbour, H.N.; Evans, G. (1991). Fertility of Superovulated Ewes following Intrauterine or Oviducal Insemination with Fresh or Frozen-Thawed Semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 3:1-7.

16- Jefferies, B.C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tas. J. Agric.* 32: 19-32.

17- Jones, R.; Mann, T. and Sheims, R. 1979. Peroxidante break down of phospholipids in human spermatozoa, spermeneidad properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil and sterility.* 31: 531-537.

18- Maxwell, W.M.C.; Evans, G.; Rhodes, S.L.; Hillard, M.A.; Bindon, B.M. (1993). Fertility of Superovulated Ewes after Intrauterine or Oviducal Insemination with Low Numbers of Fresh or Frozen-Thawed Semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:57-63.

19- -----. Salamon, S. (1993). Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reprod. Fertil.Dev.* 5:613-38.

20- -----. Stojanov, T. (1996). Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of Some Antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:1013-20.

21- -----. Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science.* 42:55-65.

22- Molinia, F.C.; Evans, G.; Quintana Casares, P.I.; Maxwell, W.M.C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 36:113-122.

23- -----. Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1994). In-vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34:491-500.

24- Preval, B.; Brito, B., Pérez, J.E.; Pérez, F. 1998. Efecto de la Lidocaína con Epinefrina en el éxito fecundante de la vaca. *Archivos de Reproducción.* 7: 6-16.

25- Roberts, S. J. (1979). *Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción.* Editorial Hemisferio Sur. Montevideo. p: 361.

- 26- Salamon, S. (1962). Studies on the artificial insemination of Merino sheep III. The effect of frequent ejaculation on semen characteristics and fertilizing capacity. *Aust. Agric. Res.* 13: 1137-1150.
- 27- ----- Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen I. Processing thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science.* 37: 185-249.
- 28- ----- Maxwell, W.M.C. (1995b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science.* 38:1-36.
- 29- SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12. Cary N.C. 1998.
- 30- Tervit, H.R. *et al.* (1984). The inseminations of sheep with fresh or frozen semen. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 44: 11-13.
- 31- Toutain, P.L.; Marnet, P.J.; Laurenti, M.P.; Garcia Villar, R.; Ruckebusch, Y. (1985). Direction of uterine contraction during estrus in ewes: an reevaluation. *Am.J.Physiol.* 249 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 18): 410- 416.
- 32- Upreti, G.C.; Payne, S.R.; Duganzich, D.M; Oliver, J.E., Smith, J.F. (1996). Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 41:27-36.
- 33- 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.* 9:321-31.
- 34- Wergin, W.P. (1985). Interaction between spermatozoa and crypts, cilia, and mucus of the cervix in the ewe. Scanning electron microscopy III. pp: 1191-1199. Sem. Inc., AMF O'Hare (Chicago). USA.

9. ANEXO:

Ensayo I:

Tabla 1.

	Cérvix (esp 106)		Utero (esp 103)		Oviductos (esp 103)	
	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>Varianza</i>
T1-2 horas	17.33		165		1.33	
	18		66.66		1.33	
	3.66		123.33		0.66	
	21.65		41.66		0.66	
	17		30		0.66	
		47.46		3277.1		0.13
T1-6 horas	8.66		71.66		2.66	
	1		14.99		0.33	
	0.33		5		0.33	
	20.66		86.66		2	
	5		43.33		0.66	
		68.44		1236.86		1.14
T1-24 horas	2		39.99		0.66	
	1.66		23.33		2	
	0.33		1.66		0.33	
	0		8.33		0.5	
	0.33		1.67		0.33	
		0.81		273.5		0.49

Tabla 2.

	Cérvix (esp 106)		Utero (esp 103)		Oviductos (esp 103)	
	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>Varianza</i>
T2-2 horas	2.66		29.99		0.66	
	7.16		29.99		1	
	-		13.33		0.33	
	6.66		15		0.66	
		6.08		83.9		0.075
T2-6 horas	6		9.99		0.33	
	2.33		9.99		0.33	
	1.66		11.67		0	
	2.66		2.49		0.66	
		3.75		16.87		0.07
T2- 24 horas	0		6.67		0.66	
	0.66		0		0	
	1.33		1.67		0.33	
	1.33		3.33		0.66	
		0.4		8.11		0.09

Tabla 3.

	Cérvix (esp 106)		Utero (esp 103)		Oviductos (esp 103)	
	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>Varianza</i>
T3-2 horas	2		1.66		0	
	3.33		4.99		0.33	
	-		0.83		0.33	
	4		4.99		1.33	
		2.08		4.79		0.33
T3-6 horas	6.33		8.32		0.33	
	4		11.66		0.66	
	1.66		5		1	
	2.66		8.33		0.33	
		4.08		7.39		0.10
T3-24 horas	2.77		8.0		1	
	3.66		14.99		0.33	
	2		8.33		1.33	
	0.33		0.5		0.33	
		2.0		35.1		0.25

Tabla 4.

	Cérvix (esp 106)		Utero (esp 103)		Oviductos (esp 103)	
	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>Varianza</i>
T4-2 horas	7.66		26.66		1	
	4		14.99		1.33	
	7.66		18.9		0.9	
	5.80		22.9		1.3	
		3.1		25.37		0.05
T4-6 horas	0.66		21.66		0.66	
	0.66		6.66		1	
	0.33		14.15		1	
	0.99		14.15		0.66	
		0		37.5		0.06
T4-24 horas	0		2.5		0.5	
	0		2.5		0.33	
	0		2.5		0.33	
	0		2.5		0.5	
		0		0		0.01

Ensayo II:

Tabla 5.

	Cérvix (esp 106)		Útero (esp 103)		Oviductos (esp 103)	
	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>Varianza</i>
T5-2 horas	24.5		50		10	
	8		48.33		0	
	5.33		10		6.66	
	19.67		15		13.33	
		84.3		452.7		32.4
T5-6 horas	0.66		8.33		3.33	
	0.33		6.66		3.33	
	0.33		6.66		3.33	
	1		5		6.66	
		0.1		1.85		2.77
T5-24 horas	0.33		8.33		10	
	0		13.33		6.66	
	0.33		6.66		10	
	0.66		5		6.66	
		0.07		12.9		3.72

Tabla 6.

	Cérvix (esp 106)		Utero (esp 103)		Oviductos (esp 103)	
	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>varianza</i>	<i>media</i>	<i>Varianza</i>
T6-2 horas	1		8.33		0	
	1		3.33		0	
	8		5		3.33	
		16.3		6.48		3.69
T6-6 horas	0.66		5		3.33	
	0		1.66		3.33	
	0		3.33	2.79	10	
		0.14				14.8
T6-24 horas	0.33		1.66		3.33	
	0.33		1.66		3.33	
	0.33		1.66		3.33	
		0		0		0