

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE SEMEN EPIDIDIMARIO
CONGELADO, OBTENIDO A DISTINTAS
HORAS “POST-MORTEM”

por

Juan Martín DA COSTA ISASA

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2008

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. M.Sc. Ph.D. Daniel Fernández Abella

Ing. Agr. M.Sc. Mario Azzarini

Dr. Álvaro López Pérez

Fecha:

12/12/2008

Autor:

Juan Martín da Costa Isasa

AGRADECIMENTOS

En primer lugar, quiero dejar expresado mi mayor agradecimiento a mi familia de la cual recibí todo el apoyo y amor necesario para cumplir con mis objetivos, y sin la cual hubiese sido imposible realizar una carrera universitaria.

Un agradecimiento muy especial al Ing. Agr. Daniel Fernández Abella, quien se brindó de forma incondicional en todo momento para la realización del presente trabajo, y de quien recibí un gran apoyo e importantes conocimientos; pero por encima de todo, con quien compartimos muy gratos momentos uniéndonos una linda amistad.

Al personal del Centro de Investigación y Experimentación “Dr. Alejandro Gallinal” (CIEDAG), perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana.

Al Ing. Agr. Pablo Bonazzo, propietario del establecimiento “Santa Clara”, por la colaboración en materiales y animales, así como también al personal de dicho predio, por la ayuda brindada.

Al Ing. Agr. Alejandro Gambeta, quien contribuyó con animales para la realización de este trabajo.

A los Ings. Agrs. Daniel Formoso y Mario Azzarini y al Dr. Álvaro López, por su colaboración y aportes técnicos.

A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA COLECTA Y LA FERTILIDAD DEL SEMEN EPIDIDIMARIO.....	2
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	7
3.1 LOCALIZACIÓN.....	7
3.2 PASTURAS.....	7
3.3 ANIMALES.....	7
3.4 SANIDAD.....	8
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	8
3.5.1 <u>Colecta y congelación de semen epididimario</u>	9
3.5.1.1 Colecta.....	9
3.5.1.2 Congelación.....	12
3.5.2 <u>Evaluación de la fertilidad del semen epididimario</u>	15
3.5.2.1 Evaluación “in vitro”.....	15

3.5.2.2 Evaluación “in vivo”	16
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	20
4.1 PESO VIVO Y PESO TESTICULAR.....	20
4.2 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA “IN VITRO”	21
4.2.1. <u>Previa congelación</u>	21
4.2.2. <u>Post-descongelación</u>	22
4.3 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA “IN VIVO”.....	24
5. <u>CONCLUSIONES</u>	26
6. <u>RESUMEN</u>	27
7. <u>SUMMARY</u>	28
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	29
9. <u>ANEXOS</u>	33

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Calidad espermática post-descongelado del semen epididimario según horas de almacenamiento post-mortem a 4-5° C.....	6
2. Tratamientos realizados para la evaluación “in vivo” del semen epididimario	9
3. Método de congelación a base de leche descremada.....	13
4. Método de congelación a base de Tris.....	14
5. Peso vivo y testicular de los carneros evaluados.....	20
6. Volumen y concentración espermática del semen eyaculado y epididimario colectados.....	21
7. Movilidad espermática del semen eyaculado y epididimario.....	22
8. Resultados reproductivos obtenidos con semen eyaculado congelado y epididimario congelado, a distintos momentos post mortem.....	24
9. Resultados reproductivos obtenidos, según diferentes métodos de Congelación del semen	25

Figura No.

1. Testículo de carnero (epidídimo).....	2
2. Vagina artificial utilizada para colecta de semen.....	10

Gráfica No.

1. Evolución de la movilidad post-descongelación.....	23
2. Resultados reproductivos obtenidos con semen eyaculado congelado y epididimario congelado, a distintos momentos post mortem.....	25

1. INTRODUCCIÓN

La recuperación de semen epididimario postmortem, es una técnica que permite la conservación de gametos de carneros de alto valor genético, que por distintas razones no se les pudo conservar semen durante su vida, o animales jóvenes que mueren en forma sorpresiva.

La colecta de semen epididimario se ha desarrollado en los últimos años en especies salvajes, especialmente en el ciervo (Zomborszky et al. 1999, Hishinuma et al. 2003, Soler et al. 2003). Esta técnica fue creada por dos motivos principales, uno, que estas especies están en vías de extinción, y el otro, por la dificultad de realizar la colecta de semen de las mismas.

La recuperación y congelación de esperma viable a partir de los epidídimos de animales muertos (recuperación post-mortem) es una interesante opción para mantener bancos de germoplasma de animales genéticamente valiosos o en peligro de extinción.

Existen factores que influyen en el resultado de esta técnica, por ejemplo las condiciones bajo las cuales el epidídimo es manipulado, pueden causar importantes cambios en la viabilidad de las muestras de esperma. Se debe considerar que los animales mueren inesperadamente y lejos del laboratorio, dónde la muestra de esperma puede ser adecuadamente procesada y almacenada. Por otra parte, existe escasa información sobre la fertilidad obtenida con semen epididimario en ovinos; reportándose en la literatura algunos trabajos donde se utilizó la fertilización “in vitro” (Garde et al. 1994, Kaabi et al. 2003).

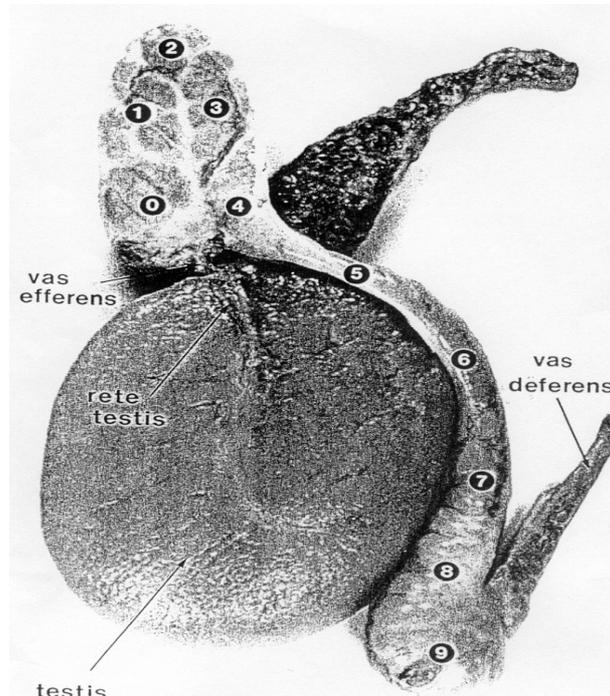
En el presente trabajo se estudiaron las variaciones individuales de la fertilidad de semen epididimario de carnero, obtenido en diferentes momentos post-mortem, comparándolo con esperma eyaculado. Además se evaluó el efecto de la época del año y dos métodos de congelación de semen.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA COLECTA Y LA FERTILIDAD DEL SEMEN EPIDIDIMARIO

Existen estudios sobre colecta de semen de la cola del epidídimo en varias especies (ovina: Voglmayr et al. 1977, Fournier Delpech et al. 1979, Garde et al. 1994, Lambrechts et al. 2000, Kaabi et al. 2003, canina: Hewitt et al. 2001, cérvida: Gilmore et al. 1998, Zomborszky et al. 1999, Hishinuma et al. 2003, Soler et al. 2003, suina: Kikuchi et al. 1998, felina, paquidérmica: Gilmore et al. 1998, bufalina: Lambrechts et al. 1999), utilizándose dos técnicas: una que realiza el trozado de la cola epididimaria con un bisturí y otra de perfusión o “flushing”, que lava el semen almacenado desde la parte media del canal deferente y de la cola epididimaria, colectándose el semen mediante una incisión en zona 9 de ésta última (Figura 1). La primera técnica tiene la desventaja de una posible contaminación con sangre, y la segunda que se debe utilizar un líquido inerte, que no contamine y que no se adhiera al semen.

Figura 1: Testículo de carnero (epidídimo): 0-2: cabeza proximal 3-4: cabeza distal 5-6: cuerpo 7-9: cola.



La cantidad o número de dosis de semen que se obtiene depende de la actividad sexual del carnero previo a la muerte, dicho número varía entre 100 a 300.¹

Aguado et al. (1994) reportó la preservación de esperma de carneros almacenado a temperatura ambiente por 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas; encontrando que el semen era de mejor calidad, antes y después del congelado, cuando se colectaba en las tres primeras horas post-mortem. Bajo condiciones similares, Garde et al. (1994) no encontraron variaciones extraordinarias en la habilidad para fertilizar ("in Vitro") de muestras epididimarias de carneros procesadas en las primeras 24 horas luego post-mortem, notando una marcada disminución en la viabilidad del esperma para períodos de tiempo más prolongados.

En el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y el muflón (*Ovis musimon*), Garde et al. (1994) concluyeron que la viabilidad y la fertilidad "in Vitro" (porcentaje de penetración ovocitos de hámster) del esperma disminuye cuando el tiempo entre la muerte del animal y el momento de la colecta del semen aumenta (por encima de 40 horas a temperatura ambiente). Estos autores destacaron que habían diferencias apreciables entre especies con respecto al test de penetración del ovocito de hámster, donde se observó una disminución particularmente más marcada en el caso del ciervo rojo. Sin embargo, Foote (2000) reportó que el esperma de los epidídimos de toros permanecen completamente funcionales por lo menos 60 horas a 5° C cuando fueron usados para inseminación artificial. Resultados similares fueron observados en suinos por Kikuchi et al. (1998) y en ratones por Kishikawa et al. (1999). Estos resultados muestran que cuando un macho muere y la criopreservación del esperma no es posible realizar inmediatamente, el almacenamiento temporal de los epidídimos a 4-5° C puede ayudar a preservar semen epididimario.

Las muestras de esperma pre-congeladas y post-descongeladas mostraron espermatozoides viables por encima de las 48 horas después de muerto el animal, sin embargo su calidad declinó significativamente a medida que aumentaba el tiempo de almacenaje post-mortem. El esperma del epidídimo almacenado a 5° C mostró una mejor motilidad y un menor porcentaje de formas anormales que los almacenados a temperatura ambiente luego de 24 y 48 horas. La habilidad para fertilizar de los espermatozoides de la cauda del epidídimo de carneros, obtenido a 0 y 24 horas luego de muerto el animal, es similar a aquellos espermatozoides eyaculados. Por lo tanto, un buen

¹Guerín, Y. 1987. Com. personal

protocolo para la recolección de semen post-mortem en carneros cuando los espermatozoides epididimarios no pueden ser colectados inmediatamente, es conservar los epidídimos a 5 ° C y procesar la muestra en las primeras 24 horas luego de muerto el animal. De acuerdo a Amann et al. (1982), Kaabi et al. (2003), en la cola de los epidídimos de carneros; aproximadamente el 88% del esperma tiene intacta la membrana plasmática. En contraste, Blash et al. (2000) observó que la motilidad pre-congelado y que la viabilidad del esperma epididimario de macho cabrío eran mayores que aquellas de semen eyaculado.

Los parámetros de calidad, motilidad total, motilidad progresiva y espermatozoides normales, los cuales muestran variaciones significativas durante las primeras 24 horas post-mortem a 4-5° C, disminuyen significativamente cuando el epidídimo es almacenado por 48 horas o más (Aguado et al. 1994, Garde et al. 1994, Kaabi et al. 2003).

El efecto benéfico de la refrigeración sobre varios parámetros de la calidad del esperma, especialmente la motilidad; pueden ser explicadas por las reducidas tasas metabólicas de las células espermáticas cuando están a 4-5 ° C (Salamon y Maxwell, 2000). Del mismo modo, Sankai et al. (2001) encontraron que la motilidad de los espermatozoides epididimarios de ratón disminuía cuando la temperatura de almacenaje se aumentaba, sugiriendo que este efecto estaba relacionado con cambios en la actividad metabólica de los espermatozoides. Sin embargo, Kikuchi et al. (1998) concluyen que la motilidad de semen epididimario de cerdo, colectado a 4° C y almacenados por 1 o 2 días, disminuye significativamente en comparación con aquel al semen de epidídimo no refrigerado (grupo control). También, la motilidad de espermatozoides de perro recuperados de epidídimos almacenados a 4° C disminuye significativamente dentro de las 48 horas de refrigeración (Yu y Leibo, 2002). Estos resultados demuestran que hay diferencias entre especies respecto al mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides a partir de epidídimos almacenados post-mortem.

En la especie ovina, la motilidad post-descongelado del semen epididimario congelado dentro de las primeras 24 horas postmortem o sacrificio, es similar a la observada en el eyaculado (Garde 1993, Martínez et al. 1994, Kaabi et al. 2003). La buena congelabilidad del esperma epididimario también fue observada por Rath y Niemann (1997) quienes encontraron un 70% de motilidad post-descongelado en espermatozoides de cerdo. Igualmente, Kikuchi et al. (1998) observaron en la misma especie, que la motilidad post-descongelado de semen de epidídimos almacenados por 1, 2 o 3 días a 4 °C no

difieren de aquellas del control. Estos autores propusieron que a pesar que la razón para la supervivencia de los espermatozoides de epidídimos a 4 ° C no esta clara, el fluido epididimario puede contener un factor de protección desconocido contra el choque térmico (Maxwell, 2007). Sin embargo, la tasa de motilidad celular post-descongelado del esperma epididimario de macho cabrío muestra una disminución mayor que aquellas de semen eyaculado (Blash et al., 2000). Estos resultados pueden ser explicados, tomando en consideración que la motilidad post-descongelado parece depender mas de la calidad inicial del semen que del método de congelamiento en sí mismo (Fernández et al., 1990).

Los resultados obtenidos por Kaabi et al. (2003) muestran que los acrosomas de espermatozoides epididimarios de carnero podrían ser sensibles a períodos de almacenamiento prolongado (48 horas). El porcentaje de acrosomas normales fue mayor cuando el semen fue preservado a temperatura ambiente (22 ° C) que cuando este fue preservado a 5° C. Inversamente, la motilidad espermática fue mayor en el semen refrigerado. También estos autores, indican que el porcentaje de espermatozoides epididimarios con acrosomas intactos es afectado por el procedimiento de congelamiento. En tal sentido, Kikuchi et al. (1998) sugieren que la integridad acrosomal en cerdos puede ser dañada durante la criopreservación, disminuyendo en la capacidad fertilizante del esperma. De acuerdo con estos autores, la motilidad del esperma y la habilidad para penetrar el ovocito (reflejada por la integridad acrosomal) son afectadas por diferentes mecanismos durante el almacenamiento en frío de los epidídimos.

Yu y Leibo (2002) determinaron que no hay una disminución significativa en la integridad de la membrana y la integridad del acrosoma de espermatozoides de perro recuperados de los epidídimos y almacenados a 4 ° C, dentro de las primeras 48 horas de refrigeración. El porcentaje de espermatozoides epididimarios con los acrosomas intactos es muy alto y muestra pequeñas variaciones dentro del primer día de refrigeración.

La habilidad para fertilizar del esperma epididimario es bien conocida. En ovejas inseminadas con espermatozoides epididimarios Fournier-Delpech et al. (1979) reportaron tasas de preñez del 80%, siendo ésta superior a la obtenida con eyaculados (72%). En los trabajos de Garde et al. (1994), Kaabi et al. (2003), no se observaron diferencias significativa en la fertilización "in Vitro", entre espermatozoides epididimarios (almacenado hasta 24 horas) y espermatozoides eyaculados. En contraste, la habilidad para fertilizar de espermatozoides epididimarios almacenados durante 48 horas disminuyó

significativamente. En otras especies, una reducción creciente en el poder fecundante del espermatozoides epididimario en relación al tiempo entre la muerte del animal y la recuperación de los gametos ha sido descrita (Kikuchi et al., 1998 en jabalí; Kishikawa et al., 1999 en ratón). Esto estaría explicado por una pérdida de la integridad acrosomal. Ikeda et al. (2000), sugieren que el mantenimiento de ésta última, es importante para la fertilización "in Vitro", mas que la motilidad espermática.

Cuadro 1. Calidad espermática post-descongelado del semen epididimario según horas de almacenamiento post-mortem a 4-5° C.

Especie	Semen congelado# o refrigerado* (horas post-mortem)	Motilidad	Porcentaje de anormales	Porcentaje de acrosomas normales	Fertilidad o poder fecundante (in Vitro)	Fuente
<i>Ovina</i>	Eyaculado#	55.8 ± 1.0a	11.0 ± 0.7 a	57.5 ± 0.9	53.0 a	Kaabi et al. (2003)
	24#	48.8 ± 2.3a	12.3 ± 0.7 b	54.4 ± 2.7	45.0 a	
	48#	30.7 ± 2.3	16.2 ± 3.9 b	47.9 ± 3.1	38.0 b	
<i>Bovina</i>	Eyaculado#				72.0	Foote (2000)
	16#				61.0	
<i>Roedores</i>	0	89 ± 5.5 a				Sankai et al. (2001)
	48*	83 ± 8.0 a				
	192*	78 ± 8.0 a				
	384*	31 ± 10.5 b				
<i>Suina</i>	Eyaculado#	44 ± 3			71 ± 10	Kikuchi et al. (1998)
	24#	38 ± 5			74 ± 22	
	48#	33 ± 5			68 ± 26	
	72#	30 ± 6			71 ± 29	
<i>Jabalina</i>	Eyaculado	70 ± 8.0				Gilmore et al. (1998)
	0	90 ± 2.0				
<i>Canina</i>	0	58 ± 3.0				Yu y Leibo (2002)
	4*	62 ± 3.0				
	6*	51 ± 3.0				
<i>Cérvida</i>	Eyaculado	84 ± 4.0				Gilmore et al. (1998)
	0	87 ± 3.0				
<i>Bufalina</i>	0	90.4 ± 2.0 a		89.3 ± 2.3 a		Lambrechts et al. (1999)
	0#	57.0 ± 2.0 b		50.2 ± 2.3 b		

Fuente: Elaboración propia

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo de campo se llevó a cabo en dos predios distintos, en uno se realizó la manipulación de los carneros (colecta y congelación de semen); y en otro predio se realizó la inseminación de hembras para evaluar la fertilidad del semen epididimario.

La colecta y congelación de semen se efectuó en el Centro de Investigación y Experimentación “Dr. Alejandro Gallinal” (CIEDAG), perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana (33°52’ latitud sur, 55°34’ longitud oeste), ubicado al noroeste del departamento de Florida, sobre la ruta nacional número 7, km. 140, a 2 km. de Cerro Colorado, en la sección policial 14ª y sección judicial 9ª, cercano al límite de los departamentos de Durazno y Lavalleja.

La inseminación se realizó en el establecimiento “Santa Clara”, perteneciente al Ing. Agr. Pablo Bonazzo (33°38’ latitud sur, 55°44’ longitud oeste). El mismo se encuentra ubicado sobre la ruta nacional número 6, km. 162.5.

3.2 PASTURAS

La zona se encuentra en un área típicamente ganadera de explotación mixta de bovinos y ovinos, de la región geológica correspondiente al Basamento Cristalino. Los suelos varían entre superficiales, medios y profundos y son de fertilidad media a baja con un alto riesgo de erosión y muy sensibles a la sequía. Las pasturas nativas que en ellos se desarrollan tienen un crecimiento marcadamente estacional de primavera y verano y su producción anual es, en promedio, de 3000 kg de materia seca por hectárea.

3.3 ANIMALES

En el verano (27 de diciembre) para la extracción de semen se usaron seis carneros de la raza Corriedale (tres de 4 dientes y tres de 8 dientes). Los mismos presentaban al momento de la colecta un peso promedio de 55.6 kg, y

una condición corporal de 3 (escala de 1 a 5). En la colecta realizada en invierno (22 de Junio) se utilizaron cinco carneros adultos de la misma raza (6 dientes) que tenían un peso promedio de 47.0 kg e idéntica condición corporal registrada en el grupo de carneros colectados en el verano.

En la evaluación “in vivo”, se inició la inseminación intrauterina con un número 424 animales de la raza Corriedale de 6 y 8 dientes, que al momento de la inseminación presentaban un peso promedio de 42 kg y estado corporal promedio de 3.5. Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas vaginales de medroxiprogesterona (60mg, Syntex®, Lab. Universal), mantenidas durante 14 días y previamente impregnadas con antibiótico en el extremo interno (Terramicina®, Lab. Dispert, Uruguay). Posteriormente debido a problemas sanitarios, el número de hembras evaluadas reproductivamente se redujo a 387. Durante este período las ovejas se encontraban en condiciones extensivas de pastoreo sobre campo natural, con una disponibilidad de forraje de más de 1000 kg de MS/ha.

3.4 SANIDAD

El estado sanitario de los carneros al momento de la colecta era bueno.

Las ovejas al momento de colocadas las esponjas presentaron un muy buen estado sanitario y nutricional. Posteriormente, a los 40 días post gestación, las mismas manifestaron importantes problemas de pietín, y como consecuencia una disminución importante en el peso y condición corporal, registrándose una pérdida entre muertes y refugos de 37 animales (8.8% del total).

Al momento de la inseminación se registraron intensas precipitaciones, que alcanzaron los 82 mm en dos días, de los tres que totalizaron los trabajos de inseminación.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron diferentes tratamientos, correspondiendo cada uno de ellos a distintos momentos de congelación del semen. Los carneros fueron castrados para evitar de este modo su sacrificio.

Se realizó una primera extracción a animales vivos, colectado por vagina artificial (día -1). A través de la técnica de Dachueux (1980), modificado por

Dachueux y Guérin², se obtuvo el semen epididimario colectado a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la castración o muerte, (día 0, día 1, día 2, día 3 y día 4 respectivamente).

Por otra parte, se utilizaron 2 diluyentes diferentes para la congelación del semen, uno a base de leche descremada (LD) y el otro a base de hidroximetilaminometano (Tris).

De esta forma se obtuvieron los siguientes tratamientos, descritos en el cuadro adjunto.

Cuadro 2. Tratamientos realizados para la evaluación “in Vivo” del semen epididimario.

Tratamiento	Tipo de colecta	Congelación (h. post-mortem)	Número de ovejas	Tipo de diluyente	
Día -1	vagina artificial	----	41	Tris	
Día 0	Epididimaria	1	56	Tris	LD
Día 1	Epididimaria	24	69	Tris	LD
Día 2	Epididimaria	48	75	Tris	LD
Día 3	Epididimaria	72	80	Tris	LD
Día 4	Epididimaria	96	66	Tris	LD

Fuente: Elaboración propia

3.5.1 Colecta y congelación de semen epididimario

3.5.1.1 Colecta

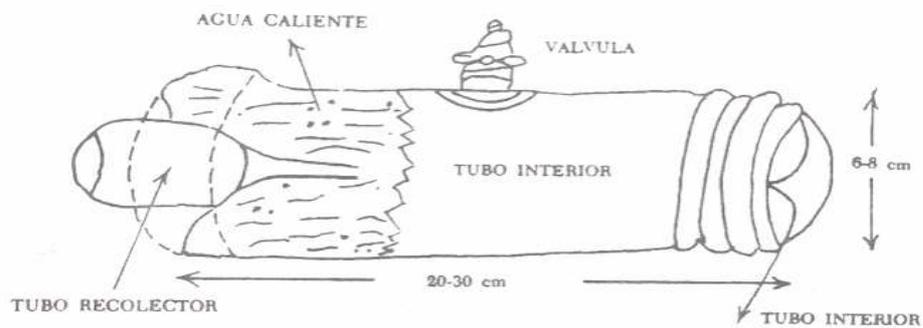
La colecta de semen se llevó a cabo en épocas distintas, una en verano y otra en invierno. En esta última época la colecta fue nula o escasa, con muy mala calidad espermática, por lo cual se desechó realizar su congelación y por ende la evaluación “in vivo” (ANEXO 2).

Para el caso del tratamiento (día -1), en el cual se extrajo el semen a animales vivos; el mismo fue colectado con el método de la vagina artificial. En primera instancia se encepó una oveja en celo y se acercó el carnero (previa limpieza del prepucio con papel) para que establezcan un primer contacto visual y olfativo. Se preparó la vagina artificial a una adecuada temperatura y presión (37-40° C), utilizando agua caliente y dando presión por la válvula de entrada

²Dacheux, J.L.; Guérin, Y. 2002. Com. personal

de aire. Este método tiende a imitar a la vagina de una oveja en temperatura y humedad. En un extremo de la vagina artificial se colocó una copa de vidrio. Una vez que el carnero quedó bien excitado se le permitió la monta desviando el pene con la mano hacia la vagina artificial adonde se produjo el eyaculado, y posterior colecta del semen en la copa de vidrio.

Figura 2: Vagina artificial utilizada para colecta de semen.



Para el caso de los restantes tratamientos (día 0, día 1, día 2, día 3 y día 4 se realizó colecta epididimaria. La misma se efectuó a través de la perfusión del contenido de semen en la cola del epidídimo. Para realizar el lavado o flushing se utilizó una aguja G21 cortada a la mitad, se liberó el testículo de su túnica vaginal, separándose los ligamentos de la cola del epidídimo y cortando la vaina para diseccionar el canal deferente a nivel de la mitad del testículo (paso 5). Se separó el extremo del canal y se introdujo la aguja sujetándola con una pinza hemostática. Con una jeringa de 2.5 mL se realizó el flushing usando 1,5 a 2 cc de una mezcla de aceites minerales (mineral oil 400-5 y M 3516, SIGMA)

(paso 7). Después de haber verificado que la aguja se encontraba dentro del canal y haberse comenzado a abultar la cola del epidídimo se rasgó la misma con una aguja (en la zona 9, Figura 1), entre dos paredes. Estas se observan como líneas blancas (paso 8).

La colecta se realizó dentro de una cámara de frío a 4-5° C. El semen de cada cola del epidídimo fue recogido en un tubo eppendorf (1.5 mL) (paso 9). Dicho semen presenta una consistencia pastosa, lo cual permite observar la finalización de la colecta cuando se detecta la llegada de las primeras gotas de aceite mineral, como burbujas, deteniéndose en dicho momento el lavado.

Secuencia de etapas de la técnica de extracción de semen epididimario:



Paso 1



Paso 2



Paso 3



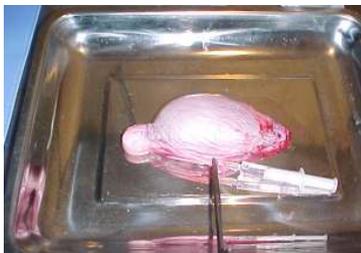
Paso 4



Paso 5



Paso 6



Paso 7



Paso 8



Paso 9

Finalizada la misma se mantuvo el semen en forma pura en propios tubos eppendorf, utilizándose una alícuota para realizar la dilución y congelación a distintos momentos post-castración. En cada momento, la alícuota de semen se depositaba en un tubo falcon (15 mL) al cual se le agregaba la cantidad necesaria del diluyente (según concentración espermática) a 4-5°C. para su congelar. Pasado un periodo de equilibrio de 90 minutos el semen se empaquetaba en pajuelas (0.25 mL).

Materiales para la extracción de semen:

Método por vagina artificial

vagina artificial
camisas de goma
copitas de vidrio
cepo
bozales
termo
pipeta graduada
conservadora

Colecta epididimaria

✓ bisturí
✓ pinza hemostática
✓ agujas G21
✓ jeringa de 2.5 mL
✓ aceites minerales:
- mineral oil 400-5
- M 3516, SIGMA
✓ tubo eppendorf (1.5 mL)

3.5.1.2 Congelación

El método empleado para la congelación fue a través de pajuelas, utilizándose dos diluyentes distintos. Uno a base de leche descremada (LD), descrito por Colas (1975) y otro a base de hidroximetilaminometano (Tris), descrito por Salamon (1976).

Cuadro 3. Método de congelación a base de leche descremada

DILUYENTE 1

✓ **LACTOSA-YEMA DE HUEVO**

20 ml de solución de lactosa (10.4 g de lactosa / 100mL de agua destilada)

DILUYENTE 2

✓ **LECHE DESCREMADA (U.H.T) CON GLICEROL AL 11 %**

9 mL de leche + 1 mL de glicerol

ANTIBIÓTICO

100000 U.I.de Penicilina + 0.1 g de estreptomina en 100 mL de leche

Fuente: Colas (1975)

En la técnica con leche descremada (LD) el diluyente se agregó en dos fases (cuadro No. 3); se realizó una primera dilución en base a lactosa y yema de huevo (31° C). Luego de un período de equilibrio de 2 horas a 4° C se agregó otro diluyente a base de LD y glicerol; después de un segundo período de equilibrio de 1-2 horas a 4° C se realizó la congelación del semen. El contenido de espermatozoides fue de 80 millones por pajueta.

La técnica utilizada para congelar con Tris es mas sencilla, ya que se agregaron todos los componentes del diluyente en una sola vez a 31° C (cuadro No. 4), y luego de un período de equilibrio de 2 horas a 4° C se congela el semen. La cantidad de espermatozoides que se conservó por pajueta fue de 50-100 millones.

Cuadro 4. Método de congelación a base de Tris

SOLUCIÓN MADRE (SM)

✓ Tris:	4.5 g
✓ Glucosa (fructosa):	0.8 g
✓ Ácido cítrico:	3.2 g
✓ Agua bidestilada:	100mL
✓ Antibiótico:	100000 U.I.de Penicilina + 0.1 g de estreptomycin en 100 mL

DILUYENTE

✓ SM:	80
✓ Yema de huevo:	15
✓ Glicerol:	5

Fuente: Salamon (1976)

Luego de realizada la dilución, se colocaron las pajuelas vacías sobre un soporte diseñado especialmente para ello. Luego se sumergió un extremo de las pajuelas sobre el semen diluido succionando por el otro, quedando de esta forma completamente llenas. Con un “peine” se extrajo el exceso de semen y se permitió la entrada de un poco de aire, de modo tal que al congelarse y descongelarse la pajueta esta cámara de aire se comprima y descomprima evitando la rotura de la pajueta rígida (Evans y Maxwell, 1990). Luego se realizó el sellado de las pajuelas introduciendo el extremo en alcohol de polivinilo e inmediatamente en agua por unos segundos y se secó con papel higiénico. Posteriormente se colocó el soporte con las pajuelas en una conservadora con nitrógeno líquido a una profundidad de dos centímetros por 10 a 15 minutos, de modo tal que la temperatura del semen no baje bruscamente. Finalmente se almacenaron las pajuelas en el termo de nitrógeno culminando así el congelado del semen.

Materiales para la congelación del semen:

- ✓ termo con nitrógeno líquido
- ✓ pajuelas
- ✓ alcohol de polivinilo
- ✓ conservadora
- ✓ toallas de papel

- ✓ pipeta automática
- ✓ placa de acrílico
- ✓ pinzas

La congelación de semen se realizó en distintos momentos:

- a) Semen en animales días previos a la castración (día -1).
- b) Semen epididimario colectado enseguida de la castración (día 0).
- c) Semen epididimario conservado puro (4-5° C) durante 24 horas post castración (día 1).
- d) Semen epididimario conservado puro (4-5° C) durante 48 horas (día 2).
- e) Semen epididimario conservado puro (4-5° C) durante 72 horas (día 3).
- f) Semen epididimario conservado puro (4-5° C) durante 96 horas (día 4).

3.5.2 Evaluación de la fertilidad del semen epididimario

La fertilidad “in vitro” se estimó mediante la evaluación de la movilidad, motilidad, y concentración del semen.

La fertilidad “in vivo” se evaluó por medio del porcentaje de ovejas preñadas (dato de ecografía), utilizando inseminación intrauterina por laparoscopia.

3.5.2.1 Evaluación “in vitro”

La evaluación “in vitro” del semen, se realizó como forma de obtener una medida indirecta de la fertilidad del carnero. Para ello se analizaron diferentes características del semen, previo al congelado, y previo a la inseminación (post descongelado).

Al momento de la extracción del semen (previo al congelado) se realizaron distintas pruebas macroscópicas (volumen, color, olor, movilidad en masa y pH) y microscópicas (concentración y movilidad).

Al momento de la inseminación se tomaron 5 pajuelas de semen congelado por tratamiento y se descongelaron a 35° C durante 35 segundos, evaluándose el porcentaje de movilidad total y progresiva, promediando tres

campos al microscopio (NIKON, Eclipse E 200), por pajuela y luego se evaluó el promedio de todas las pajuelas. Se determinó la concentración a través de recuento por cámara de Neubauer, realizando una dilución 1:200 en suero fisiológico formolado al 1 %.

3.5.2.2 Evaluación “in vivo”

La evaluación “in vivo” de la fertilidad, se realizó según el porcentaje de ovejas preñadas, de un total de hembras a las que se le realizó inseminación artificial intrauterina por laparoscopia. Los datos se analizaron en base a los resultados obtenidos en la ecografía.

Sincronización del celo

La sincronización del celo se realizó el 13 de marzo con esponjas a base de MAP (60 mg. acetato de medroxiprogesterona) (SINCROCEL, Lote N° 93, Laboratorio Universal Lab. Ltda.). Las mismas fueron colocadas con la mano usando un guante especial, previa pulverización con antibiótico (Multicilina) para evitar infecciones.

Las esponjas permanecieron durante 11-13 días en las ovejas, momento en el que se retiraron las mismas de forma gradual, haciendo lotes al azar de modo tal que, entre el retiro de las esponjas y la inseminación artificial transcurran 55-65 horas.

Al momento de retiradas las esponjas se realizó una aplicación de 500 U.I. de P.M.S.G. (gonadotropina coriónica equina), de modo de inducir la ovulación (Novormon 5000, Lote N° 1003 Laboratorio SYNTEX S.A.).

Inseminación artificial intrauterina por laparoscopia (IAIU)

La inseminación artificial se realizó entre el 27 y el 30 de marzo. Las ovejas permanecieron en ayuno (de alimento y agua) durante 10-12 horas antes de la inseminación, para facilitar el vaciado de los intestinos y de la vejiga.

El instrumental necesario para la IAIU consistió en:

- ✓ Camillas
- ✓ Laparoscopio:
 - fuente de luz

- lente óptica
- trocars y vainas
- palpadores
- pinzas
- ✓ Aplicador de semen (transcap)
- ✓ Cilindro de CO₂
- ✓ Cloruro de benzalconio al 1%
- ✓ Alcohol
- ✓ Antiséptico (yodoformo)
- ✓ Esponja de baño
- ✓ Conservadora
- ✓ Termo con agua a 37° C
- ✓ Recipiente con tubos de ensayo
- ✓ Tijera

Para la sujeción de la oveja se usaron dos camillas especiales, las cuales permiten colocar la oveja en un ángulo de 30-45°, con los cuartos levantados, de forma que se produzca la inoculación del semen en forma perpendicular a la pared uterina.

Luego de colocar la oveja en la camilla se esterilizó su piel con un antiséptico local (yodoformo), usando una esponja de baño y se insertó el trocar y la vaina principal a 3-4 centímetros del pezón evitando los vasos sanguíneos. Posteriormente, se retiró el trocar y se introdujo el endoscopio (lente), y se realizó el neumoperitoneo (separación del peritoneo) introduciéndose 2 a 3 litros de gas, de modo de tener una buena visibilidad y evitar que moleste el contenido abdominal.

Luego se insertó el trocar secundario, por donde se introdujo el transcap, y se colocaron los cuernos uterinos en posición, introduciéndose el semen en forma perpendicular a los mismos. La dosis aplicada fue de 40 millones de espermatozoides totales por oveja, (20 millones en cada cuerno), finalizando de esta forma la inseminación.

Paralelamente a esta actividad, se iba descongelando el semen. Para ello, se sumergieron las pajuelas en agua a 35° C durante 35 segundos, luego se cortaron los extremos de las mismas, depositándose el semen en un tubo de ensayo.



Camilla en posición horizontal (izquierda) y en posición de inseminación (derecha).



Oveja sobre la camilla, previo a la inseminación.



Aplicación de la dosis de semen en cada cuerno.

Ecografía

La fertilidad “in vivo” se evaluó con el dato de preñez. Para ello se realizó ecografía, (ALOKA SSD 500) con una sonda transrectal (modelo UST-588-5 Mhz) a partir de los 40 días post servicio. Se registró la presencia y número de fetos, así como también la presencia de vestigios de pérdidas embrionarias tardías. Los registros obtenidos fueron utilizados para determinar la fertilidad, prolificidad y fecundidad.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete Estadístico SAS. Se determinó un nivel de significación de 5 %. Los contrastes entre medias fueron realizados a través de la prueba de diferencia mínima significativa (MDS), y las diferencias entre porcentajes por medio de la prueba no paramétrica de Chi cuadrado (χ^2).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PESO VIVO Y PESO TESTICULAR

Cuadro 5. Peso vivo y testicular de los carneros evaluados

CARAVANA	Peso Vivo	Peso Testicular (5° C)		
		DERECHO	IZQUIERDO	TOTAL
36	73,5	438,7	424,7	863,4
80	66,5	193,8	190,6	384,4
2793	63,0	204,6	197,6	402,2
3239	63,5	199,3	197,3	396,6
4359	70,0	206,6	200,9	407,5
4407	80,0	308,3	292,8	601,1
PROMEDIO	69,4 (± 6.5)	258,5 (± 98.2)	250,65 (± 93.6)	509,2 (± 191.8)

Fuente: Elaboración propia

El peso vivo de los carneros fue variable pero acorde con un peso normal. Si bien el número de animales no permite realizar un análisis estadístico, se observa la inexistencia de una relación entre el peso testicular y el peso vivo. Esto concuerda con la reportado en la literatura, donde se cita una relación nula entre peso corporal y testicular en el carnero a partir de los 4 dientes (Ortavant 1958, Skinner et al. 1968, Yarney et al. 1990, Fernández Abella y Villegas 1992). Asimismo, se observa una tendencia a un mayor peso testicular (3,2%) del testículo derecho, tanto de los carneros colectados en verano, como en invierno (cuadro 5 y anexo 2).

4.2 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA “IN VITRO”

4.2.1. Previa congelación

Cuadro 6. Volumen y concentración espermática del semen eyaculado y epididimario colectados

CARAVANA	SEMEN EYACULADO			SEMEN EPIDIDIMARIO		
	Volumen	Concentración	Total 10 ⁹	Volumen	Concentración	Total 10 ⁹
36	1.5	3.25	4.88	1.0	7.600	7.60
80	1.2	3.40	4.08	0.6	8.450	5.07
2793	1.0	3.50	3.50	1.2	12.200	14.64
3239	1.0	3.10	3.10	0.3	10.480	3.14
4359	0.8	3.20	2.56	1.2	12.100	14.52
4407	1.2	3.800	4.56	0.6	12.050	7.23
PROMEDIO	1.1	3.38	3.78	0.82	10.480	8.70
	(± 0.24)	(± 0.25)	(± 0.89)	(± 0.37)	(± 2.02)	(± 4.83)

Fuente: Elaboración propia

Las características seminales en volumen y concentración concuerdan con los valores normales presentes en la raza Corriedale en nuestro país (Pérez Clariget et al. 1992, Fernández Abella et al. 1993).

Respecto al semen epididimario tanto en volumen como en concentración, los datos obtenidos son similares a los reportados por la literatura (Kaabi et al., 2003). Es destacable la alta concentración del semen epididimario lo cual determina una consistencia pastosa lo que facilita su colecta.

No existieron variaciones individuales importantes en la concentración espermática, tanto en el semen colectado por eyaculación, como para el caso del semen epididimario. Si se observaron variaciones importantes en el volumen del semen colectado, especialmente en el caso del semen epididimario (21.8 y 45.1 %, semen eyaculado y epididimario respectivamente). Estas variaciones en volumen son las que determinan las variaciones en la cantidad total de semen colectado.

Cuadro 7. Movilidad espermática del semen eyaculado y epididimario.

CARAVANA	Días de conservación a 4-5° C					
	- 1 (*)	0	1	2	3	4
36	75 – 80	60 – 75	55 – 65	50 – 55	45 – 55	45 – 50
80	70 – 80	70 – 80	60 – 65	45 – 55	60 – 70	30 – 35
2793	65 – 75	75 – 85	80 – 85	55 – 60	45 – 55	30 – 40
3239	70 – 75	70 – 75	---	50 – 60	50 – 55	40 – 50
4359	70 – 85	75 – 85	60 – 75	45 – 50	50 – 55	45 – 50
4407	70 – 75	70 – 75	70 – 75	65 – 70	45 – 55	45 – 50
Promedio	74.0 ± 3.0	80.8 ± 7.2	72.1 ± 9.5	60.1 ± 6.8	58.3 ± 5.9	45.4 ± 5.6

Fuente: Elaboración propia

(*) semen eyaculado

La movilidad espermática del semen disminuyó ($p < 0.01$) a medida que transcurrieron los días de conservación del mismo a 4-5° C, lo cual concuerda con la bibliografía, donde se destaca una disminución significativa de la motilidad cuando el semen epididimario es almacenado por 48 horas o más (Aguado et al. 1994, Garde et al. 1994, Kaabi et al. 2003). Las pérdidas de movilidad pasados el primer día de conservación son importantes.

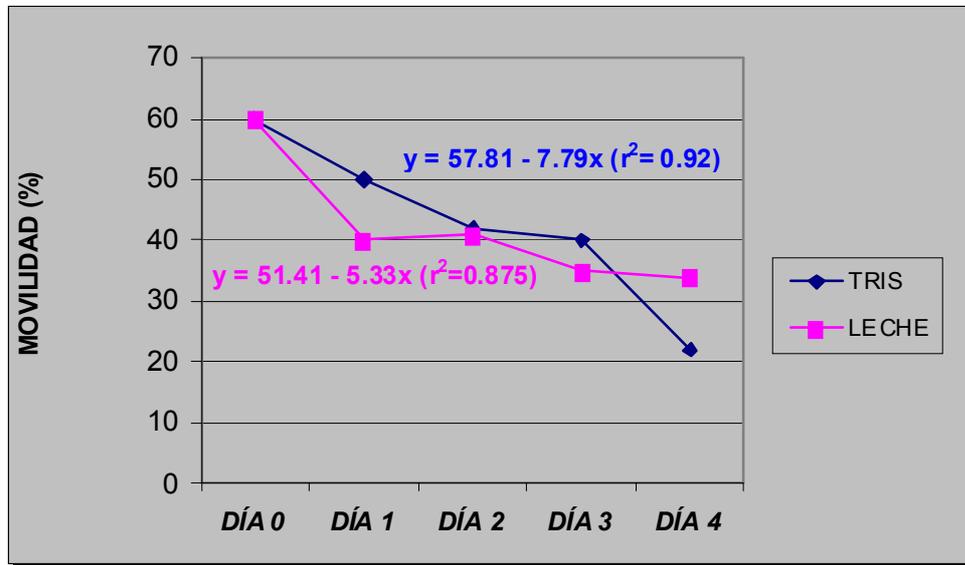
No se encontraron diferencias significativas entre el semen eyaculado y el semen epididimario colectado el día del sacrificio (día 0) y al día siguiente (día 1). Los valores encontrados los días 2 y 3 post-mortem son estadísticamente inferiores pero mostraron valores de movilidad aceptables para ser congelados. El día 4 se observaron valores estadísticamente inferiores, y biológicamente bajos como para obtener una buena congelación espermática.

4.2.2 Post-descongelación

Al igual que lo observado previo a la congelación del semen, la movilidad espermática post-descongelación disminuyó significativamente a medida que aumentaron las horas de colectado el mismo luego de la muerte de los carneros (Gráfica 1).

La movilidad del semen post-descongelación no presenta diferencias con respecto al semen previo a su congelación, esto puede deberse a que el fluido epididimario podría contener un factor de protección desconocido contra el choque térmico (Maxwell, 2007).

Gráfica 1. Evolución de la movilidad post-descongelación



Fuente: Elaboración propia

Tampoco se observaron diferencias significativas en la movilidad espermática, usando dos métodos diferentes de congelación (0.94 y 0.96 valores de correlación entre motilidad post descongelado y horas de conservación utilizando leche descremada y Tris respectivamente). Esta ausencia de diferencia entre métodos podría estar explicado, según Fernández et al. (1990) a que la motilidad pos-descongelado depende más de la calidad original del semen que del método de congelación.

El semen epididimario post-descongelado mostró valores similares al semen eyaculado, cuando el primero fue colectado los días 0 y 1 post mortem. Esto concuerda con lo observado en otros estudios en los que la calidad espermática decae rápidamente a partir del segundo día post mortem (Aguado et al. 1994, Garde et al. 1994, Kaabi et al. 2003).

4.3 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA “IN VIVO”

Cuadro 8. Resultados reproductivos obtenidos con semen eyaculado congelado y epididimario congelado, a distintos momentos post mortem

<i>Tratamiento</i>	<i>Fertilidad (%)</i>	<i>Prolificidad (%)</i>	<i>Fecundidad (%)</i>
Día -1	56.1 a	114.6 a	64.3 a
Día 0	46.4 a	110.7 a	51.4 ab
Día 1	44.9 a	104.3 b	46.8 b
Día 2	32.0 b	104.0 b	33.3 c
Día 3	28.8 b	101.3 b	29.2 c
Día 4	25.8 b	101.5 b	26.2 c

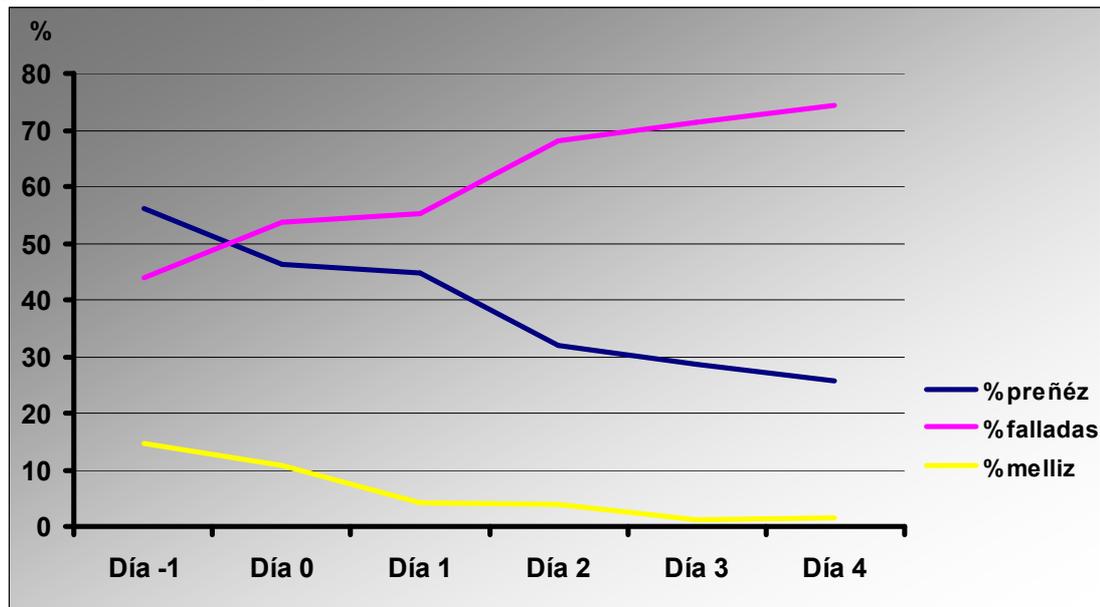
Fuente: Elaboración propia

La fertilidad de las ovejas presentó una significativa disminución a medida que aumentó el tiempo de colectado el semen de los carneros posterior a su muerte (Cuadro 8 y Gráfica 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre semen congelado eyaculado o epididimario colectados los días 0 y 1. Los menores valores de fertilidad obtenidos con semen epididimario los días 2, 3 y 4 de conservación no mostraron diferencias entre ellos ($p > 0.05$). Similar evolución presentó la prolificidad, con una disminución del número de mellizos y como consecuencia de ello, también disminuyó la fecundidad. La prolificidad obtenida con semen epididimario el día 0 no es estadísticamente diferente de la obtenida con semen eyaculado. Las prolificidades obtenidas con semen epididimario los días 1, 2, 3 y 4 no difieren entre sí y son significativamente inferiores al día 0 y semen eyaculado ($p < 0.05$).

La fecundidad obtenida con semen epididimario los días 2, 3 y 4 fue significativamente inferior que la obtenida con semen eyaculado y con semen epididimario congelado los días 0 y 1 (Cuadro 8). El valor de fecundidad obtenido el día 1 fue estadísticamente inferior al obtenido con el semen eyaculado. El valor de fecundidad del día 0, determinó un valor de fecundidad intermedio entre los anteriores. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Dachuex, J.L. y Guérin, Y.² en un reducido número de ovejas.

A pesar de la disminución en los resultados reproductivos; luego de cuatro días conservado el semen epididimario se obtuvo 26 % de fertilidad y un porcentaje similar de fecundidad.

Gráfica 2. Resultados reproductivos obtenidos con semen eyaculado congelado y epididimario congelado, a distintos momentos post mortem



Fuente: Elaboración propia

Cuadro 9. Resultados reproductivos obtenidos, según diferentes métodos de congelación del semen

Tratamiento	LECHE			TRIS		
	Fertilidad (%)	Prolificidad (%)	Fecundidad (%)	Fertilidad (%)	Prolificidad (%)	Fecundidad (%)
Día -1	-	-	-	56.1	114.6	64.3 (41)
Día 0	44.7	113.2	50.6 (38)	50.0	105.6	52.8 (18)
Día 1	42.5	105.0	44.6 (40)	48.3	103.4	49.9 (29)
Día 2	36.1	102.8	37.1 (36)	28.2	105.1	29.6 (39)
Día 3	27.8	100.0	27.8 (36)	29.5	102.3	30.1 (44)
Día 4	30.3	103.0	31.2 (33)	21.2	100.0	21.2 (33)

Fuente: Elaboración propia

Con respecto al tipo de diluyente utilizado, no se observaron diferencias significativas, en los tres parámetros reproductivos evaluados.

5. CONCLUSIONES

La evaluación de uso de semen epididimario se ha restringido a especies salvajes, existiendo información muy parcial en especies domésticas. En el carnero los escasos trabajos publicados no evalúan la fertilidad "in vivo". El presente trabajo ha permitido demostrar que bajo nuestras condiciones es posible utilizar semen epididimario con resultados satisfactorios.

No obstante, el semen obtenido por la colecta (eyaculado) es de mejor calidad que el semen epididimario obtenido post-mortem, garantizando mejores resultados reproductivos. Las horas que transcurren entre que el carnero muere y se le extrae el semen afectan negativamente la calidad del mismo y por lo tanto los resultados reproductivos obtenidos.

No se observaron diferencias significativas usando dos métodos diferentes de congelación (leche descremada y Tris) sobre la calidad espermática, ni sobre su fertilidad. La movilidad espermática, el volumen de semen y la concentración del mismo, disminuyeron a medida que aumentaron las horas de colectado el semen luego de la muerte de los carneros. Esto se vio reflejado en la fertilidad de las ovejas, la misma presentó una significativa disminución a medida que aumentó el tiempo de colectado el semen de los carneros posterior a su muerte.

De todas formas se debe destacar que luego de transcurridos cuatro días de la muerte de los animales, el semen permanece en el epidídimo de forma activa, pudiendo obtenerse resultados de 26 % de fecundidad.

Esto permite asegurar que la colecta de semen epididimario post-mortem se trata de una herramienta, que si es aplicada de la manera correcta (primeras horas post-mortem) permite la conservación de gametos de carneros de alto valor genético a los que por algún motivo no se les pudo extraer el semen previo a su muerte.

6. RESUMEN

La colecta de semen epididimario fue desarrollada con el objetivo de almacenar semen en especies salvajes, en las que existe dificultad de realizar la colecta, o en especies que están en vías de extinción. Permite además la conservación de semen de animales a los que no se les pudo colectar previo a su muerte, o animales que mueren en forma sorpresiva. Existe escasa información sobre la fertilidad obtenida con semen epididimario en ovinos. En el presente trabajo se estudiaron las variaciones individuales en la calidad del semen epididimario de carnero, obtenido en diferentes momentos post-mortem. Una muestra de 11 carneros de la raza Corriedale fueron utilizados, a los que se les conservó semen a través del eyaculado colectado en vagina artificial, y luego se les conservó semen extraído del epidídimo a diferentes horas postmortem. De esta forma se obtuvieron 6 tratamientos (semen de animales vivos, colectado por vagina artificial (día -1) y semen epididimario colectado a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la muerte, (día 0, día 1, día 2, día 3 y día 4 respectivamente). Se evaluó la calidad del semen en cada tratamiento. La fertilidad "in vitro" se estimó mediante la evaluación del volumen, la movilidad y la concentración. La fertilidad "in vivo" se evaluó por medio del porcentaje de ovejas preñadas, utilizando inseminación intrauterina por laparoscopia. La calidad del semen disminuyó a medida que aumentó el tiempo de colectado el semen de los carneros posterior a su muerte, afectando negativamente los resultados reproductivos. La fecundidad obtenida fue de 64,3; 51, 4; 46,8; 33,3; 29,2 y 26,2 % para el semen eyaculado y el semen epididimario conservado 0, 1, 2, 3 y 4 días, respectivamente. Estos resultados muestran que la recuperación y congelación de esperma viable a partir de los epidídimos de animales muertos es una opción para mantener bancos de germoplasma de animales genéticamente valiosos que mueren en forma repentina.

Palabras clave: Carnero; Semen epididimario; Fertilidad; Métodos de congelación.

7. SUMMARY

The collection of the epididymal semen was developed with the purpose of storing semen in wild species, in which there is difficulty of performing the collection, or in endangered species. It also allows the conservation of semen of animals in which the collection was not executed before their death, or animals that die in an unexpected way. There is little information regarding the fertility obtained with epididymal semen in sheep. In the following essay, individual variations on the quality of the epididymal semen of the ram have been studied, obtained in different post-death moments. A sample of 11 ram of the Corriedale breed were used, their semen was conserved through the ejaculation collected in the artificial vagina, and afterwards semen extracted from the epididymal at different post-death timings were conserved. In this way, 6 treatments were obtained (semen of alive animals, collected by artificial vagina (day -1) and semen epididymal collected at 0, 24, 48, 72 and 96 hours subsequent to death, (day 0, day 1, day 2, day 3 and day 4 respectively). The quality of the semen of each treatment was evaluated. The fertility "In Vitro" was estimated by the evaluation of the volume, the mobility and concentration. The fertility "in-vivo" was evaluated by the percentage of pregnant sheep, using intrauterine insemination by laparoscopy. The quality of the semen reduced as time passed, time of the collection of the ram semen subsequent to it was death, affecting negatively the reproductive results. The fertility obtained was of 64, 3; 51, 4; 46,8; 33,3; 29,2 y 26,2 % for semen ejaculated and semen epididymal conserved 0, 1, 2, 3 and 4 days, respectively. This results show that the recovery and freezing of the viable sperm starting from the epididymides of dead animals is an option to keep banks of germoplasme of animals genetically valuable that dye in sudden ways.

Keywords: Ram; Epididymal semen; Fertility; Freeze methods.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUADO, M.J.; GARDE, J.; MADRIADANO, J.M.; PÉREZ, S.; GARRIDO, D.; MONTORO, V. 1994. Congelación post mortem de semen de epidídimo de morueco. In: Jornadas Internacionales de Reproducción Animal (7as., 1994, Murcia, Spain). Memorias. s.n.t. p. 283.
2. AMANN, R.P.; HAY, S.R.; MAMMERSTEDT, R.H. 1982. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol. Reprod.* 27:723-733.
3. BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology.* 54:899-905.
4. COLAS, G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fert.* 42:277-285.
5. DACHEUX, J.L. 1980. An in vitro luminal perfusion technique to study epididymal secretion. *IRCS Medical Science.* 8: 137.
6. FERNANDES, P.A.; McCOSHEN, J.A. CHEANG, M.; KRENTSER, J.V.; WODZICKI, A.M. 1990. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fertil. Steril.* 54: 322-327.
7. FERNÁNDEZ ABELLA, D. 1987. Temas de reproducción ovina. Montevideo, Universidad de la República. División de Publicaciones y Ediciones. 254 p.
8. _____; PIZZARROSA, O.; VILLEGAS, N. 1992. Efecto del tipo de diluyente y método de congelación sobre la fertilidad del semen ovino. *ITEA.* 88A(3): 191-196.
9. _____. 1993. Principios de fisiología reproductiva ovina. Montevideo, Universidad de la República. División de Publicaciones y Ediciones. 247 p.

10. FOOTE, R.H. 2000. Letter to editor. *J. Androl.* 21(3):355.
11. FOURNIER-DELPECH, S.; COLAS, G.; COUROT, M.; ORTAYANT, R.; BRICE, G. 1979. Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19: 597-605.
12. GARDE, J. 1993. Congelación de semen en la especie ovina. Características biológicas de las dosis descongeladas. Doctoral Thesis. Madrid, Spain. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. s.p.
13. _____; AGUADO, M.J.; MONTORO, V.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; GARCÍA, O.; PÉREZ, S.; GARZÓN, A. 1994. Estudio post mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen de morueco; resultados preliminares. *In: Jornadas de la SEOC (18as., 1994, España). Proceedings. s.n.t. pp. 533-537.*
14. _____; PÉREZ, S.S.; AGUADO, M.J.; GARRIDO, D.; AYLLON, E.; MONTORO, V.; DÍAZ, J.D. 1994. Evolución post mortem de la viabilidad y de la capacidad fecundante del semen de ciervo y de muflón. *In: Jornadas de la SEOC (19as., 1994, Burgos, Spain) Proceedings. s.n.t. pp. 542-545.*
15. GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; ASHWORTH, E.; ACKER, J.P.; RAATH, J.P.; BUS, M. 1998. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Anim. Reprod. Sci.* 53: 277-97.
16. HEWITT, D.A.; LEAHY, R.; SHELDON, R.; SHELDON, I.M.; ENGLAND GC. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67:101-11.
17. HOLT, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology.* 53: 47-58.

18. IKEDA, H.; KIKUCHI, K.; NOGUCHI, J.; TAKEDA, H.; SHIMADA, A.; MIZOKAMI, T. 2002. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology*. 57: 1309-18.
19. KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, JC.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*. 60: 1249-1259.
20. KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N.; IKEDA, H.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4° C. *Theriogenology*. 50: 615-23.
21. KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4° C. *J. Reprod. Fertil.* 116: 217-222.
22. LAMBRECHTS, H.; VAN NIEKERK, FE.; COETZER, WA.; CLOETE, SWP.; VAN DER HORST, G. 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology*. 52: 1241-9.
23. MARTÍNEZ, J.; LIMAS, T.; PERÓN, N. 1994. Daily production and testicular and epididymal sperm reserves of Pelibuey rams. *Theriogenology*. 41:1595-9.
24. ORTAVANT, R. 1958. Le cycle spermato-genetic chez le bélier. Thèse Dr. Science. Paris, France. Université de Paris VI. s.p.
25. PEREZ CLARIGET, R.; LÓPEZ, A.; LABORDE, D.; QUEIROLO, D.; FRANCO, J. 1992. Estacionalidad reproductiva en carneros. In: Congreso Nacional de Veterinaria (1992, Montevideo, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, s.e. pp. 86-90.

26. RATH, D.; NIEMANN, H. 1997. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*. 47: 785-93.
27. SALAMON, S. 1976. Artificial insemination of sheep. Chippendale, Australia, N.S.W. Publicity. p.86
28. _____; MAXWELL, W.M. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Repr. Sci.* 62: 77-111.
29. SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; OGONUKI, N. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 55:1759-68.
30. SKINNER, J.D.; BOOTH, W.D.; ROWSON, L.E.A.; KARG, H. 1968. The post-natal development of the Suffolk ram, and changes in the gonadotrophin content of the pituitary. *J. Reprod. Fert.* 16: 463-477.
31. YARNEY, T.A.; SANFORD, L.M.; PALMER, W.M. 1990. Pubertal development of ram lambs; body weight and testicular size measurements as indices of postpubertal reproductive function *Canadian Journal of Animal Science* 70:139-147.
32. YU, I.; LEIBO, S.P. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored. *Theriogenology*. 57:1179-90.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 10. Resultados reproductivos obtenidos, a partir del método de congelación a base de leche descremada

LECHE			
		N°	%
Día - 1	ov. Insem	0	0
	Tot ov preñ.	0	0
	Ov. Preñ 1	0	0
	Ov. Melliz	0	0
	Ov. Fall	0	0
Día 0	ov. Insem	38	100
	Tot ov preñ.	17	44.7
	Ov. Preñ 1	12	31.6
	Ov. Melliz	5	13.2
	Ov. Fall	21	55.3
Día 1	ov. Insem	40	100
	Tot ov preñ.	17	42.5
	Ov. Preñ 1	15	37.5
	Ov. Melliz	2	5.0
	Ov. Fall	23	57.5
Día 2	ov. Insem	36	100
	Tot ov preñ.	13	36.1
	Ov. Preñ 1	12	33.3
	Ov. Melliz	1	2.8
	Ov. Fall	23	63.9
Día 3	ov. Insem	36	100
	Tot ov preñ.	10	27.8
	Ov. Preñ 1	10	27.8
	Ov. Melliz	0	0.0
	Ov. Fall	26	72.2
Día 4	ov. Insem	33	100
	Tot ov preñ.	10	30.3
	Ov. Preñ 1	9	27.3
	Ov. Melliz	1	3.0
	Ov. Fall	23	69.7

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 11. Resultados reproductivos obtenidos, a partir del método de congelación a base de Tris

TRIS			
		N°	%
Día - 1	ov. Insem	41	100
	Tot ov preñ.	23	56.1
	Ov. Preñ 1	17	41.5
	Ov. Melliz	6	14.6
	Ov. Fall	18	43.9
Día 0	ov. Insem	18	100
	Tot ov preñ.	9	50.0
	Ov. Preñ 1	8	44.4
	Ov. Melliz	1	5.6
	Ov. Fall	9	50.0
Día 1	ov. Insem	29	100
	Tot ov preñ.	14	48.3
	Ov. Preñ 1	13	44.8
	Ov. Melliz	1	3.4
	Ov. Fall	15	51.7
Día 2	ov. Insem	39	100
	Tot ov preñ.	11	28.2
	Ov. Preñ 1	9	23.1
	Ov. Melliz	2	5.1
	Ov. Fall	28	71.8
Día 3	ov. Insem	44	100
	Tot ov preñ.	13	29.5
	Ov. Preñ 1	12	27.3
	Ov. Melliz	1	2.3
	Ov. Fall	31	70.5
Día 4	ov. Insem	33	100
	Tot ov preñ.	7	21.2
	Ov. Preñ 1	7	21.2
	Ov. Melliz	0	0.0
	Ov. Fall	26	78.8

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 2.

Cuadro 12. Colecta epididimaria de invierno.

		PESO TESTICULAR			
CARAVANA	DENTICIÓN	PESO VIVO	DERECHO	IZQUIERDO	TOTAL
264	6 D	51.0	120.0	113.2	233.2
3360	6 D	44.0	117.7	108.1	225.8
4242	6 D	50.0	151.5	147.9	299.4
4074	6 D	50.5	224.0	214.6	438.6
8113	6 D	39.5	91.3	90.4	181.7
PROMEDIO		47.0	140.9	134.84	275.74

Fuente: Elaboración propia

Relación derecho/izquierdo: 1.045