



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**"EFECTO DEL TRATAMIENTO POST-DESCONGELADO CON MEDIOS
ISOOSMÓTICOS DEL SEMEN OVINO SOBRE LA CINÉTICA ESPERMÁTICA
Y LA FERTILIDAD."**

por

Br. Victoria ZUGARRAMURDI
Br. Martina ZULUAGA

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2022

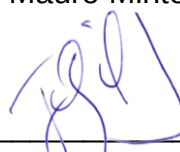
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Mauro Minteguiaga

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Jorge Gil

Tercer miembro:



Dr. Juan Carlos Orihuela

Cuarto miembro (Co-Tutor):



Dra. Victoria Pons

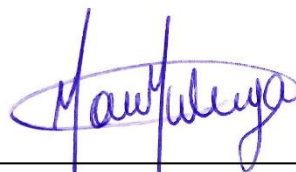
Fecha:

20 de Diciembre de 2022

Autores:



Br. Victoria Zugarramurdi



Br. Martina Zuluaga

AGRADECIMIENTOS

- A nuestro tutor, el Dr. Jorge Gil, quien fue el responsable de guiarnos principalmente en el trabajo práctico, como también en el teórico.
- A la Dra. Victoria Pons, nuestra cotutora por apoyarnos, guiarnos y estar siempre a las órdenes para la escritura de la tesis.
- A la familia Aguerre de la cabaña “El Arazá”, por brindarnos sus instalaciones y animales para poder realizar el trabajo de IAIU.
- Al establecimiento “María Inés” por brindarnos las instalaciones y animales para realizar el trabajo de IAIC.
- Al Dr. Gabriel Duran, por brindarnos su conocimiento y realizar la IAIU.
- Al Dr. Juan Manuel Duran, por realizar las ecografías.
- Por último y no menos importante agradecemos a nuestras familias y amigos que nos apoyaron y contuvieron en todo este proceso haciendo más llevadero este camino.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	3
LISTADO DE FIGURAS	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
Introducción.....	10
Revisión bibliográfica	13
1. Inseminación artificial	13
1.1. Inseminación artificial con semen congelado.....	14
1.2. Técnicas de IA	14
2. Semen	15
2.1 Fisiología del espermatozoide	15
2.2. Metabolismo espermático	16
2.3. Capacitación espermática.....	16
2.4. Plasma seminal.....	17
2.5. Evaluación del semen.....	17
3. Espermatozoides en tracto reproductor de la hembra.....	19
4. Estrés congelación/descongelación	20
5. Tratamiento de semen post descongelado.....	23
6. Diluyentes.....	23
6.1. Medio de mantenimiento (Holding)	24
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	25
Objetivo General	25
Objetivos Particulares	25
Materiales y métodos	25
1- Ensayo in-vitro	25
1.1 Semen	26
1.2 Tratamientos.....	26
1.3 Evaluación seminal	26
2. Ensayo <i>in-vivo</i>	27

2.1. Inseminación intracervical.....	27
2.2. Inseminación intrauterina.....	27
2.3. Evaluación de fertilidad.....	28
3. Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS	30
1. Resultados in vitro	30
1.1. Motilidad.....	30
1.2. Velocidad curvilínea.....	31
1.3. Velocidad rectilínea.....	31
1.4. Velocidad promedio	31
1.5. Distancia de la trayectoria circular	32
1.6. Distancia de la trayectoria recta.....	32
1.7. Distancia de la trayectoria promedio.....	32
1.8. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza	33
1.9. Frecuencia de cruce de la trayectoria, Hz.....	33
1.10. Índice de oscilación	34
1.11. Índice de linealidad	34
1.12. Rectitud de trayectoria VSL/VAP	35
2. Resultados in vivo:	35
2.1. Inseminación intracervical.....	35
2.2. Inseminación Intrauterina.....	36
DISCUSION	36
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS.....	39

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática de los parámetros de motilidad obtenidos por el CASA (Quintero-Moreno et al., 2003). Línea roja: trayectoria media del espermatozoide en el tiempo considerado (velocidad media, VAP). Flechas negras: distancia recorrida por el espermatozoide en su trayectoria real en función de tiempo de captura considerado (VCL). Flecha lila: desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH). Flecha gris: distancia recorrida en línea recta por el espermatozoide entre el primer y último punto de su trayectoria real (velocidad lineal, VSL).	19
Figura 2 Esquema de eventos físicos en la célula durante la congelación. Los hexágonos grises representan cristales de hielo (Adaptado de Mazur, 1985).	21
Figura 3 Motilidad progresiva (MP), Motilidad progresiva rápida (MPR) y Motilidad progresiva lenta (MPL) de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio Bovihold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de ningún medio (CTRL).	30
Figura 4 Motilidad circular (MC) de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio Bovihold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de ningún medio (CTRL).	30
Figura 5 Velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad promedio (VAP) de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) o sin agregar ningún medio (CTRL).	32
Figura 6 Distancias recorridas de trayectoria circular (DCL), de la trayectoria recta (DSL) y de la trayectoria promedio (DAP) por los espermatozoides con incubación posdescongelado en los medios BoviHold® (HOLD), leche UHT o sin agregar ningún medio (CTRL).	33
Figura 7 Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides incubados posdescongelado en el control (CTRL), o con el agregado de leche (UHT) o medio Bovihold® (HOLD).	33
Figura 8 Frecuencia de cruce de la trayectoria de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) o sin el agregado de un medio (CTRL).	34
Figura 9 Índice de oscilación de los espermatozoides incubados posdescongelado con el agregado de medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de un medio (CTRL).	34
Figura 10 Índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides incubados post descongelado con el agregado de medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de un medio (CTRL).	35

Figura 11 Rectitud de trayectoria (STR) de los espermatozoides incubados posdescongelado con el agregado de medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de un medio (CTRL)..... 35

RESUMEN

El objetivo de este ensayo fue evaluar el tratamiento posdescongelado, con medios de transición osmótica (300 mOsm), del semen ovino sobre la cinética espermática y la fertilidad. El estudio se dividió en dos experimentos: *in vitro* e *in vivo*. Para el estudio *in vitro* se utilizó semen comercial de seis carneros. Se realizó un pool con dos pajuelas de semen posdescongelado de cada carnero para la evaluación y se tomaron tres alícuotas del pool: una incubada a 37°C en igual volumen (100 µL) del diluyente de congelación (CTRL), otra con leche descremada larga vida (UHT) y otra en BoviHold® (HOLD, Minitube, Alemania). La evaluación del semen se realizó mediante el sistema CASA (AndroVision®, Minitube, Alemania), considerando los parámetros de motilidad, distancia de trayectoria (circular, lineal y promedio), velocidades de trayectoria (curvilínea: VCL, recta: VSL, y promedio: VAP), índices de linealidad (LIN), rectitud de trayectoria (STR), índice de oscilación (WOB), frecuencia de cruce de trayectoria (BCF) y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Cada muestra se evaluó a los 5 min y 10 min. El estudio *in vivo* implicó al tratamiento de semen posdescongelado (HOLD) para la inseminación intracervical (IAIC, 200 ovejas Merino Dohne) e intrauterina (IAIU, 160 ovejas Merino Australiano). En cada inseminación, la mitad de las ovejas fueron inseminadas con semen control (sin tratamiento posdescongelado, CTRL) y la otra mitad con semen tratado (5 minutos previo a la IA). Para la inseminación intracervical (IAIC) se utilizó semen descongelado de cuatro carneros en pool antes de la inseminación, en ovejas en celo natural. Para la IAIU se sincronizaron las ovejas con esponjas impregnadas en progesterona (60 mg) por 12 días y gonadotrofina coriónica equina (300 UI) al retiro; la laparoscopia se realizó a las 60hs. Se evaluó la fertilidad a los 55 días mediante ecografía transabdominal. Los resultados *in vitro* indican que hubo efecto de la incubación del semen posdescongelado en HOLD; se incrementaron las variables de motilidad circular (MC), velocidad (VSL y VAP), distancias (DCL, DSL y DAP), BCF e índices LIN, STR y WOB; no hubo efecto en MP (motilidad progresiva), MPR (motilidad progresiva rápida), VCL y ALH respecto del CTRL; sin embargo, MPL (motilidad progresiva lenta) disminuyó. El UHT fue menor que el CTRL en las variables MP, MPR, VCL y ALH, aumentando la MC. Cuando comparamos los dos tratamientos (UHT y HOLD) se vieron diferencias significativas en las variables MP, MPR, MC, VCL, VSL, VAP y ALH; HOLD generó valores superiores en estas variables. En cuanto a la fertilidad obtenida en el experimento *in vivo*, no hubo diferencias significativas entre CTRL y HOLD, independientemente de la vía de IA. Se concluye que el tratamiento posdescongelado mejora los parámetros de calidad seminal *in vitro*, pero no la fertilidad con dosis comerciales de buena calidad.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the post-thaw treatment, with osmotic-transition media (300 mOsm), of the ram semen on sperm kinetics and fertility. The study was divided into two experiments: *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* study, commercial semen from six rams was used. Two semen doses from each ram were thawed and pooled; for evaluation, three aliquots from the pool were taken: the first incubated at 37°C with the same volume (100 µL) of the freezing extender (CTRL), the second in UHT (long-life skim milk) and third, in BoviHold® (HOLD, Minitube, Germany). Semen evaluation was performed using a CASA system (AndroVision®, Minitube, Germany), considering the motilities, distances (circular, linear, and average), speeds (curvilinear: VCL, straight: VSL, and average: VAP), linearity indices (LIN), straightness (STR), oscillarity (WOB), cross frequency of the path (BCF), and lateral head amplitude (ALH). Each aliquot was evaluated at 5 min and 10 min. The *in vivo* study involved thawed semen treated (HOLD) for intracervical (IAIC, 200 Dohne Merino ewes) and intrauterine (IAIU, 160 Australian Merino ewes) insemination. At each insemination, half of the ewes were inseminated with control semen (CTRL, without treatment post-thaw) and the other half with treated semen (5 min prior to AI). For intracervical insemination (IAIC), thawed and pooled semen from four rams was used to inseminate ewes in natural estrus. For IAIU, the ewes were synchronized with vaginal pessaries impregnated with progesterone (60 mg) for 12 days and equine chorionic gonadotropin (300 IU) at withdrawal; laparoscopy was performed at 60h. Fertility was assessed at 55 days by transabdominal ultrasound. The *in vitro* results indicate that there was a significative effect of the incubation in HOLD on thawed semen; the circular motility (MC), speed (VSL and VAP), distances (DCL, DSL and DAP), BCF; indices of LIN, STR and WOB increased; there was no effect on MP (progressive motility), MPR (rapid progressive motility), VCL and ALH with respect to CTRL; however, MPL (slow progressive motility) decreased. The variables MP, MPR, VCL and ALH, UHT were lower than the CTRL; however, MC increased. Comparing the two treatments (UHT and HOLD), significant differences were found in MP, MPR, MC, VCL, VSL, VAP and ALH; HOLD achieved higher values in these variables. The fertility obtained in the *in vivo* experiment did not yield significant differences between CTRL and HOLD for both AI routes. It is concluded that the post-thawing treatment improves seminal quality parameters *in vitro*, but not the fertility of high-quality commercial doses.

INTRODUCCIÓN

La cría de ovinos tiene más de 150 años de desarrollo en Uruguay. Los primeros ovinos llegaron en el siglo XVII, traídos por los portugueses. Luego se fueron importando animales de diferentes razas destinados al mejoramiento genético ovino, especialmente dirigidos a la producción de lana (Economía.uy, 2022). La cantidad de ovinos en Uruguay llegó a un pico máximo de 26,5 millones de cabezas en 1991. En los siguientes 25 años se genera un descenso sostenido en el stock (Fig.1). De acuerdo con la declaración jurada del 30 de junio de 2020 la existencia de ovinos es de 6.263.000 cabezas (Bervejillo y Bottaro, 2020).

El mejoramiento genético ovino se refiere al proceso de desarrollo de atributos de interés económico de una población y tiene como objetivo la utilización de la variación genética para aumentar la producción o cambiar la población en la dirección deseada. El interés por evaluar genéticamente los animales se da porque un animal productivamente superior transmitirá sus características a su descendencia, la identificación de los animales genéticamente superiores es lo que nos permitirá mejorar la eficiencia generación tras generación (Bravo Marchan y Romero Yáñez, 2012). Conlleva una gran inversión de dinero y de tiempo, acompañado de algunas limitaciones como puede ser el transporte de animales desde otros países, los costos, enfermedades que pueden estar asociadas al ingreso de esos animales, etc. Como medida para intentar resolver las limitaciones mencionadas surgen las biotecnologías reproductivas. Nos referimos a técnicas aplicadas a la reproducción animal que intentan acelerar en forma importante el posible progreso genético resultante de mezclar diferentes genotipos dentro de una especie. El uso de biotecnologías en la reproducción permite obtener individuos nuevos y mejorados en un tiempo menor respecto a la mejora que se podría lograr con una encarterada (Rodríguez, Vallejo, Batista, y Espasandin, 2011). Dentro de las biotecnologías de la reproducción se encuentran desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación; dichas técnicas permiten aumentar la eficiencia reproductiva. La IA es una técnica en la que el semen previamente obtenido del macho es depositado en el tracto reproductivo de la hembra, no existiendo contacto directo entre el macho y la hembra (Durán del Campo, 1980). La IA está estrechamente relacionada con el desarrollo de técnicas para la preservación de semen. Esto favorece el uso eficiente y prolongado de los carneros superiores que conectan diferentes majadas, lo que es muy importante en un programa de selección (Gil y Olivera, 2005).

La técnica de IA se puede realizar vía cervical, transcervical o intrauterina, pudiendo utilizar semen fresco, refrigerado o congelado. El uso de semen fresco por vía cervical es lo más habitual en ovinos, dado que se necesita menor capacitación técnica, menor costo de la técnica, menor tiempo por animal, posibilita la masificación en la población animal y se obtienen resultados

similares a los obtenidos con monta natural (Evans y Maxwell, 1987). Por otra parte, el uso de semen congelado permite acelerar aún más el mejoramiento genético, debido a que es posible el transporte de semen a nivel internacional, permitiendo el acceso a carneros de genética superior, ubicados en otros países. La congelación de semen genera cambios a nivel de los espermatozoides, que provoca un deficiente pasaje de los espermatozoides a través del cérvix, lo cual lleva a la necesidad de implementar la técnica por laparoscopia vía intrauterina como respuesta a los bajos resultados por vía cervical obtenidos con semen congelado (Eppleston y Maxwell, 1993; Salamon y Maxwell, 1995). Con la técnica de IAIU por vía laparoscópica se necesita de un equipo especializado (laparoscopio), que es de mayor costo y requiere mayor tiempo por oveja (Campbell, Harvey, Mc Donald y Sparksman, 1996). Con esta técnica, se logran hoy en día porcentajes de preñez superiores al 50% (Gibbons y Cueto, 2008). Además, esta técnica permite realizar un uso muy eficiente del semen, al depositarse la dosis de inseminación dentro del útero, basta un bajo número de espermatozoides para preñar una hembra. Dado que estamos frente a una técnica semiquirúrgica se debe tener en cuenta el bienestar animal durante la misma.

El proceso de congelación y descongelación del semen provoca en el espermatozoide una serie de alteraciones que provocan cambios en parámetros de calidad como la motilidad, estructura espermática, viabilidad, dando como resultado la reducción de la fertilidad al inseminar por vía cervical (Salamon y Maxwell, 1995), e impidiendo mejores tasas de preñez. Durante la congelación, los espermatozoides sufren estrés osmótico, térmico y físico por la cristalización. Una vez descongelado el semen, el 40-60% de los espermatozoides mantiene su motilidad, pero solo un 20-30% de ellos se encuentran sin daño estructural grave. Esto demuestra que un espermatozoide puede mantener su motilidad, pero perder la capacidad de fertilizar un óvulo debido a las alteraciones sufridas (Salamon y Maxwell, 2000). En el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a procesos de deshidratación e hidratación lo que da como resultado significativos cambios de volumen. El primer cambio de volumen sucede cuando una célula se coloca dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol, y luego existe un cambio de volumen cuando la solución es congelada. Más tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelular (Stornelli, Tittarelli, Savignone y Stornelli, 2005).

Otros factores de estrés que sufren los espermatozoides son los cambios de temperatura, estrés tóxico producido por la exposición a crioprotectores, la formación y disolución de hielo, así como los cambios de osmolaridad en el ambiente extracelular (Leibo y Bradley, 1999). Con respecto a los cambios de

temperatura, es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 y 0 °C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento (Watson, 1995). Sin embargo, un lento enfriamiento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana (Crowe, Carpenter, Crowe y Anchordoguy, 1990). En un estudio se obtuvo evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjurias observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación. Estas evidencias fueron obtenidas a partir del estudio de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero durante los procesos de enfriamiento (entre 5 y -20°C) y posterior calentamiento hasta 30°C. Se observó que los mayores daños de membrana ocurrían durante el proceso de calentamiento durante la descongelación (Holt y North, 1991).

Con respecto a la exposición a los crioprotectores se sabe que son utilizados porque permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas, en consecuencia, una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Ha sido demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas del glicerol en el proceso de criopreservación (Gao et al., 1993). Mazur (1984) estableció que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson y Duncan, 1988). Sin embargo, la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular lo cual es letal para la célula (Mazur, 1984). Holt y North (1991) han demostrado que los signos de estrés manifestados por los espermatozoides luego de la descongelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado, sino también con el estrés sufrido durante el congelado.

Dada la disminución de fertilidad ocasionada por la preservación del semen, se realizaron estudios en los que se planteó que la resuspensión de espermatozoides congelados/descongelados en plasma seminal podrían revertir los cambios ocasionados por la congelación. Con el agregado de plasma seminal en el medio de descongelación se vio un efecto favorable en la estabilización e integridad de membranas plasmáticas y acrosomales y permitió mejorar las tasas de movilidad espermática (Domínguez et al., 2008; Maxwell et al., 1999). La fertilidad del semen tratado con plasma seminal ha sido controversial, con estudios que reportan fertilidad similar a la del semen fresco (Domínguez et al., 2008; Maxwell y Johnson, 1999) hasta otros en que no hallaron ningún efecto

beneficioso (López Pérez y Pérez-Clariget, 2012). El semen eyaculado está compuesto por espermatozoides y plasma seminal, secretado por las glándulas accesorias del macho. El plasma seminal ha sido muy estudiado y se llegó a comprobar que su presencia, o el de un medio de reemplazo similar es necesario para mantener la viabilidad de los espermatozoides, incluso por un corto periodo de tiempo, si el semen se mantuvo in vitro (Maxwell, Graaf, Ghaoui y Evans, 2007).

Teniendo en cuenta esto, en este estudio se busca por medio del uso de medios de osmolaridad similar con el medio uterino, amortiguar el shock osmótico al momento de la inseminación y reducir el estrés espermático posibilitando una mejora de la fertilidad. Se espera demostrar que con el agregado de medios a la descongelación del semen se mejoran los parámetros de calidad cinética de los espermatozoides y la fertilidad a la inseminación cervical e intrauterina por vía laparoscópica. Al incubar el semen en medios isoosmolares en igual proporción que el semen descongelado (1:1) el cambio osmótico es gradual entre el medio de congelación (1200 mOsm) y el medio uterino (280-300 mOsm), reduciendo el estrés de los espermatozoides, mejorando la motilidad espermática y la fertilidad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Inseminación artificial

La IA es la operación en la cual se introduce el semen en el tracto genital femenino por medios artificiales sin que se produzca la monta directa (coito). El semen es recolectado previamente, y en varios casos es evaluado macroscópicamente, ya que, a nivel nacional es muy difícil que los productores tengan las condiciones necesarias para efectuar el análisis microscópico del semen (Fernández Abella, 2015). Cuando se utiliza semen fresco es conveniente realizar la inseminación lo más rápido posible, debe mantenerse a temperatura ambiente (20-30°C) por no más de 2 horas. En caso de querer conservar el semen más tiempo, se debe diluir y almacenar entre 10 y 15°C, de esta manera mantiene buena fertilidad durante 12 horas. El uso de semen congelado se ajusta más a la IAIU, aunque si el semen es de excelente calidad se pueden obtener buenos resultados con IAIC (34% de preñez, Fernández Abella, 2015).

Además, debemos tener en cuenta que el cuello uterino de la oveja es difícil de penetrar y atravesar. El no poder manipular el cuello uterino por el recto cómo se hace en la vaca genera una gran dificultad. Por lo que el uso de semen congelado/descongelado, requiere una deposición dentro del útero, mediante laparoscopia, para lograr buenos resultados de fertilización (Menchaca, Vilarino, Crispo, de Castro y Rubianes, 2009). El empleo de semen congelado puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al aumentar

considerablemente el flujo del material genético de las cabañas hacia las majadas generales. Además, se evita el costoso traslado de los reproductores, y se disminuye el riesgo sanitario (Gibbons y Cueto, 1995).

1.1. Inseminación artificial con semen congelado

El uso de semen congelado es una valiosa herramienta para acelerar el progreso genético. Se obtienen buenos resultados cuando se utiliza la vía intrauterina. Sin embargo, estos resultados decaen cuando se utiliza la vía cervical, dada la baja capacidad de progresar de los espermatozoides desde el punto de deposición hasta el lugar de fecundación del ovocito (Salamon y Maxwell, 1995). Según la información nacional publicada, la fertilidad alcanzada por vía cervical esta entre 10 y 30% (Azzarini y Valledor, 1988; Gil, Rodrigues-Irazoqui, Söderquist y Rodriguez-Martinez, 2002). Estudios más recientes señalan que la fertilidad en inseminación cervical profunda con el semen congelado varía entre 25-35% (Anel et al., 2005; Faig, et al., 2012), y en inseminación vaginal es aún menor 5-15% (Cseh, Faig y Amridis, 2014). Con el método intrauterino se puede lograr una fertilidad entre 60-75% (Bancheva, Stoycheva, Dimitrova, y Markov, 2021).

1.2. Técnicas de IA

1.2.1 Método vaginal o “a ciegas”:

El semen es depositado en la cavidad vaginal, requiriendo gran cantidad de espermatozoides. Este método desvirtúa uno de los principales fines de la IA, o sea, el uso más eficiente del semen eyaculado (Fernández Abella, 2015).

Muchas veces se debe realizar por no ser posible la introducción de la cánula en el cérvix, aumentando la dosis (dos o tres veces) para incrementar la probabilidad de fecundación (Fernández Abella, 2015).

1.2.2. Método cervical:

La estructura del cuello del útero impide que la cánula se introduzca más de 0,5-1,0 cm (Dun, 1995). La complejidad del cérvix aumenta con la edad de la oveja por los pliegues que se forman en la membrana de la mucosa de la pared vaginal. Estos están asociados a traumas ocurridos durante el parto. Por esto es más dificultoso encontrar el orificio del cuello del útero en ovejas adultas (Fernández Abella, 2015).

La técnica consiste en introducir el vaginoscopio y luego la pistola dosificadora dentro del mismo, con la ayuda de este, se retira el mucus exterior para facilitar la observación del orificio. Es un método barato y relativamente fácil,

regularmente se utiliza semen fresco, el cual puede o no ser refrigerado (Aguilar, 2010).

La dosis con semen fresco no debe ser menor a 60 millones para no perder fertilidad. El volumen de la dosis no debe ser mayor a 0,06 cc (6 rulos). Cuando el mismo sea superior (semen conservado), se debe dividir la dosis en 2 o 3 pistolazos. Cuando se usa semen congelado por vía cervical se deben utilizar dosis superiores a los 120 millones (Gibbons y Cueto, 1995).

1.2.3. Método intrauterino:

Existen dos técnicas posibles, la transcervical o laparoscópica. La última es la más utilizada, con la cual se obtienen resultados iguales o superiores a los obtenidos con el método cervical, permitiendo utilizar menores cantidades de células espermáticas (20-50 millones de semen fresco), lo cual significa una enorme economía especialmente trabajando con semen congelado, donde se utiliza una dosis de 50-100 millones de células espermáticas (Fernández Abella, 2015).

La técnica de inseminación intrauterina por laparoscopia consiste en depositar el semen directamente en la luz de los cuernos uterinos (Gibbons y Cueto, 1995). El semen se introduce en los cuernos del útero permitiendo mantener la capacidad fertilizadora por 18-35 horas y utilizar menor cantidad de espermatozoides (Fernández Abella, 2015). Esto permite obtener, mediante una adecuada dilución y fraccionamiento del semen, entre 60 y 150 dosis fecundantes de un mismo eyaculado (3000-7000 millones de espermatozoides) (Gibbons y Cueto, 1995).

Mayor investigación y comprensión es lo necesario para lograr la penetración cervical, es decir la inseminación transcervical, utilizando semen congelado-descongelado tendría el potencial para reemplazar la vía laparoscópica en algunas situaciones (Salamon y Maxwell, 1995). La completa penetración del cuello uterino en la inseminación aumentó el número y la calidad de los espermatozoides alcanzando los oviductos (Fukui y Roberts, 1977). En un estudio realizado por Halbert, Dobson, Walton, Sharpe, y Buckrell (1990), solo en el 54% de las ovejas se logró la penetración total del cérvix, y de ellas, el 82% quedo preñada, por lo que solo el 44% de las ovejas inseminada se preñan.

2. Semen

2.1 Fisiología del espermatozoide

El semen ovino está formado por plasma seminal (74%) y las células espermáticas (26%) (Salamon, Maxwell y Evans, 1990). Los espermatozoides

son células altamente especializadas, adaptadas estructural y bioquímicamente para el transporte de material genético masculino a través del tracto reproductivo femenino (Bustamante, 2010), no tienen la capacidad de sintetizar proteínas luego de la espermatogénesis (Sánchez-Luego et al., 2004). A pesar de que pierden en gran parte el citoplasma, conservan estructuras como el aparato de Golgi y mitocondrias ajustadas en polos opuestos, y el citoesqueleto está adaptado para la movilidad en una matriz líquida (Barrios et al., 2000; Bustamante, 2010).

Los gametos masculinos son producidos en los testículos, maduran y se almacenan en el epidídimo para ser secretados posteriormente en la eyaculación junto con el plasma seminal, secreciones fisiológicas de glándulas sexuales accesorias (Gwathmey, Igotz, Mueller, Manjunathy, Suarez., 2006; Rodríguez Villamil et al., 2016), que cumplen papeles importantes durante la migración en el tracto reproductivo femenino, en la capacitación y en la posterior fertilización de los óvulos (Kelly et al., 2006; Rego et al., 2014). Luego de la maduración y del paso por los túbulos seminíferos, son liberados en la eyaculación junto con el plasma seminal en el tracto genital femenino donde se activa el movimiento flagelar adquirido previamente en el epidídimo (Olivera, Arg, Ruiz, Tarazona y Giraldo, 2006).

2.2. Metabolismo espermático

La energía necesaria para mantener la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, preferentemente la fructosa, presente en el plasma seminal. La glucosa es metabolizada por los espermatozoides, y además la utilizan como componente de varios diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides se produce dióxido de carbono (CO₂), agua y algo de ácido láctico (Salamon et al., 1990). El CO₂ en altas concentraciones tiene la capacidad de inhibir el metabolismo de los espermatozoides y puede ser utilizado como método de conservación a corto plazo. El semen sin diluir incubado durante largos periodos de tiempo puede acumular CO₂ en cantidades suficientes para inhibir la motilidad de los espermatozoides. En estos casos se puede recuperar la motilidad diluyendo el semen con diluyente fresco. En cambio, si se acumula ácido láctico metabólico en el semen, el pH puede descender y puede reducir, irreversiblemente, la viabilidad de los espermatozoides. Consecuentemente el semen se debe utilizar lo más fresco posible (Salamon et al., 1990).

2.3. Capacitación espermática

Los espermatozoides maduran en el epidídimo, pasan por los túbulos seminíferos y son liberados en la eyaculación junto con el plasma seminal en el tracto genital femenino. Inmediato a la eyaculación no tienen la capacidad de

fertilizar un óvulo. Esta capacidad la adquieren en el tracto genital femenino, luego de una serie de cambios en la composición y estructura de la membrana plasmática (Garner y Hafez, 2000). Luego de la capacitación se da la reacción acrosómica y un cambio en el patrón de movimiento espermático conocido como motilidad hiperactivada (Bedford, 1983). La conservación del semen genera cambios similares a una capacitación prematura de los espermatozoides, lo que provoca una longevidad disminuida y que adquieran capacidad fecundante al momento de alcanzar el lugar de fertilización. Este es un proceso frecuente en los espermatozoides de carnero y explica en parte la dificultad para obtener buenos resultados de preñez con semen conservado (Watson, 2000).

2.4. Plasma seminal

El plasma seminal es la secreción fisiológica de las glándulas del aparato reproductor del macho (Moura, Koc, Chapman y Killian, 2006). Salamon et al. (1990) señala que el plasma seminal de los carneros es un líquido opaco o claro, aunque el semen puede ser de color blanco o cremoso, debido a su alta concentración en espermatozoides. El plasma se compone principalmente por agua (75%), aunque también presenta sustancias orgánicas e inorgánicas que son protectores y sirven de nutrientes para los espermatozoides. Este líquido es normalmente isotónico y neutro. Las principales sustancias orgánicas presentes en el semen de carnero son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, gliceril fosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7 por un complejo sistema amortiguador. Éste protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas (Salamon, et al., 1990).

Además, tiene un rol importante en el aporte de energía a los espermatozoides desde su formación hasta el transporte por el tracto genital de la hembra (Maxwell et al., 2007) y funciona como vehículo de los espermatozoides eyaculados (Muino-Blanco, Perez-Pe, Cerbani-Perez, 2008). Además, protege a los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra, modulando la reacción inflamatoria post monta y evitando que los espermatozoides vivos sean fagocitados en el útero (Alghamdi, Foster y Troedsson, 2004; Troedsson et al., 2005).

2.5. Evaluación del semen

El sistema computarizado de análisis de semen (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) combina una cámara termostáticamente controlada, en la cual se deposita una alícuota de semen y se mantiene a la misma temperatura durante el examen (37°C). Además, posee un sistema óptico con iluminación de contraste de fase, un detector de imágenes, un sistema de computarización y un monitor de vídeo (Brogliatti, 2008). El sistema nos abastece de medidas

cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides, y nos permite obtener información acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas (Mortimer y Maxwell, 2004).

El software de este sistema identifica y mide automáticamente los parámetros de movimiento de los espermatozoides en campos microscópicos con objetivo 10x y con contraste de fase negativa. El tiempo de análisis es de 1 segundo por campo (Bernardi, Allende, Mazzeo, Monti, Marini, 2011). En la Figura 2 vemos representado esquemáticamente los parámetros de motilidad. Los resultados de los análisis incluyen: concentración, motilidad total, motilidad progresiva (lenta, rápida y circular), motilidad local e inmóviles. También incluyen: las distancias de la trayectoria circular (DCL), de la línea recta entre el punto inicial y el punto final de la secuencia y la distancia promedio de la trayectoria circular (DAP) con las respectivas velocidades de las trayectorias. Velocidad curvilínea o VCL ($\mu\text{m/s}$), velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. Velocidad rectilínea o VSL ($\mu\text{m/s}$), velocidad media medida en una línea recta desde el principio hasta el final de la trayectoria recorrida. Velocidad media o VAP, velocidad media del recorrido del espermatozoide. En base a las velocidades el sistema evalúa los índices de linealidad (%) ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$), estima la proximidad de las trayectorias de las células espermáticas a una línea recta; de rectitud de trayectoria ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$), estima la proximidad del recorrido seguido por las células espermáticas a una línea recta y el de oscilación ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}$), la frecuencia de cruce de la trayectoria (BCF) y la amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (AHL) (Quintero-Moreno, Miro, Rigau, Rodríguez-Gil, 2003).

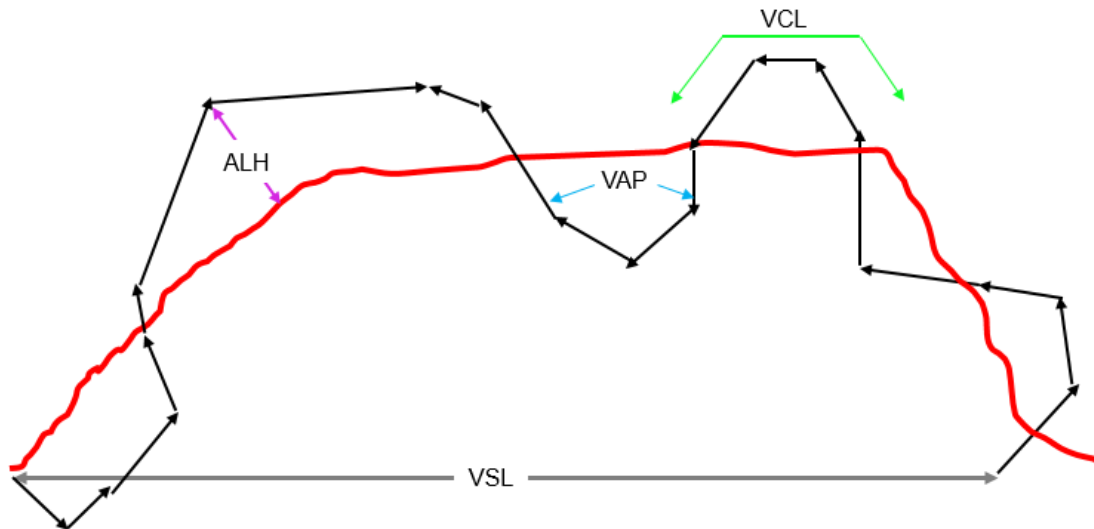


Figura 1 Representación esquemática de los parámetros de motilidad obtenidos por el CASA (Quintero-Moreno et al., 2003). Línea roja: trayectoria media del espermatozoide en el tiempo considerado (velocidad media, VAP). Flechas negras: distancia recorrida por el espermatozoide en su trayectoria real en función de tiempo de captura considerado (VCL). Flecha lila: desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH). Flecha gris: distancia recorrida en línea recta por el espermatozoide entre el primer y último punto de su trayectoria real (velocidad lineal, VSL).

3. Espermatozoides en tracto reproductor de la hembra

Los espermatozoides son liberados en la eyaculación junto con el plasma seminal en el tracto genital femenino donde se activa el movimiento flagelar adquirido previamente en el epidídimo (Olivera et al., 2006). Los espermatozoides sufren una serie de modificaciones estructurales y metabólicas durante su tránsito a través del tracto genital femenino, iniciando con la hiperactivación y capacitación (de Lamirande, Leclerc Gagnon, 1997), proceso caracterizado por el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol y la salida de colesterol de la membrana del espermatozoide gracias al papel receptor y la gran concentración de albúmina y lipopolisacáridos de alta densidad presente en el fluido oviductal (Leahy y Gadella, 2015). Cuando los espermatozoides entran en contacto con la zona pelúcida, inician la reacción acrosómica que resulta en la fusión del acrosoma con la membrana del espermatozoide. Este fenómeno promueve el contacto entre los receptores de unión entre el espermatozoide y el óvulo (Poiani, 2006; Wassarman, Jovine, Litscher, Qi, Williams, 2004; Poiani, 2006).

4. Estrés congelación/descongelación

La estabilidad celular se mantiene a temperaturas por debajo de -130°C , temperatura a la cual no se detectan reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula (Mazur, 1984). El congelado, es una técnica muy difundida, que tiene como finalidad conservar material biológico a muy bajas temperaturas por tiempo indefinido. Este proceso conlleva la interrupción artificial del proceso de maduración y fertilización o muerte de los espermatozoides (Watson, 1995). Este proceso de congelación es reversible, de forma tal que una vez que ocurre la IA se da la reactivación de los procesos necesarios para la fecundación (Foote, 1984; Foote y Parks, 1993). En este complejo proceso de criopreservación, inciden múltiples factores que afectan la conservación de las células y la recuperación posdescongelado de las cualidades que estas poseían previo a la misma. Las células experimentan estrés producto de importantes cambios físicos en su pasaje del estado líquido a sólido (Holt, 2000).

La formación de hielo intracelular durante el proceso de congelado es inevitable. Cuando la temperatura desciende lentamente de 0°C ($<10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y comienza la congelación, alrededor de una molécula de agua que se cristaliza espontáneamente se fusionan otras formando un “núcleo de congelación” sacando los solutos del diluyente a áreas no congeladas, aumentando la presión osmótica y disminuyendo el punto de fusión en este sitio (supercooling, entre -5 y -15°C). Con esta gran concentración de solutos, ocurre el llamado “efecto solución”, el espermatozoide se deshidrata y disminuye su volumen, la membrana plasmática se arruga y se expone a daños (Hammerstedt, Graham y Nolan, 1990; Holt, 2000; Mazur, 1985; Watson, 2000). A tasas de congelación mayores a la óptima ($10-20^{\circ}\text{C}$) es insuficiente el tiempo para que salga el agua intracelular, así como para evitar la formación de cristales intracelulares con el consiguiente efecto letal sobre la célula (Figura 3). En presencia de glicerol, el punto de fusión disminuye y provee un medio para mantener en suspensión (o solución) a los elementos excluidos en el supercooling, también en los canales no congelados para alojar a los espermatozoides (Mazur, 1985). La curva de congelación debe ser lo suficientemente lenta para permitir la salida de agua de los espermatozoides, pero también lo suficientemente rápida para evitar la formación de cristales muy grandes que dañen el interior de la célula (Holt, 2000; Mazur, 1985).

Además, a medida que se congela el agua dentro de la célula también ocurre lo mismo con el agua que se encuentra fuera de ésta, este proceso lleva a la concentración de solutos extracelulares, esta alta concentración externa supone un estrés osmótico para el espermatozoide (Mazur et al., 1970), debido tanto a la pérdida de agua que sufre como al ingreso de algunos solutos (Mazur et al., 1984). Estos procesos suponen deshidratación celular y con ello una disminución

del tamaño, si esta disminución sobrepasa un límite crítico, la bicapa de fosfolípidos de la membrana se rompe y con ello, se altera la entrada y salida de componentes, el contenido celular se vierte al exterior y el hielo extracelular penetra hacia el interior del espermatozoide (Mazur et al., 1984).

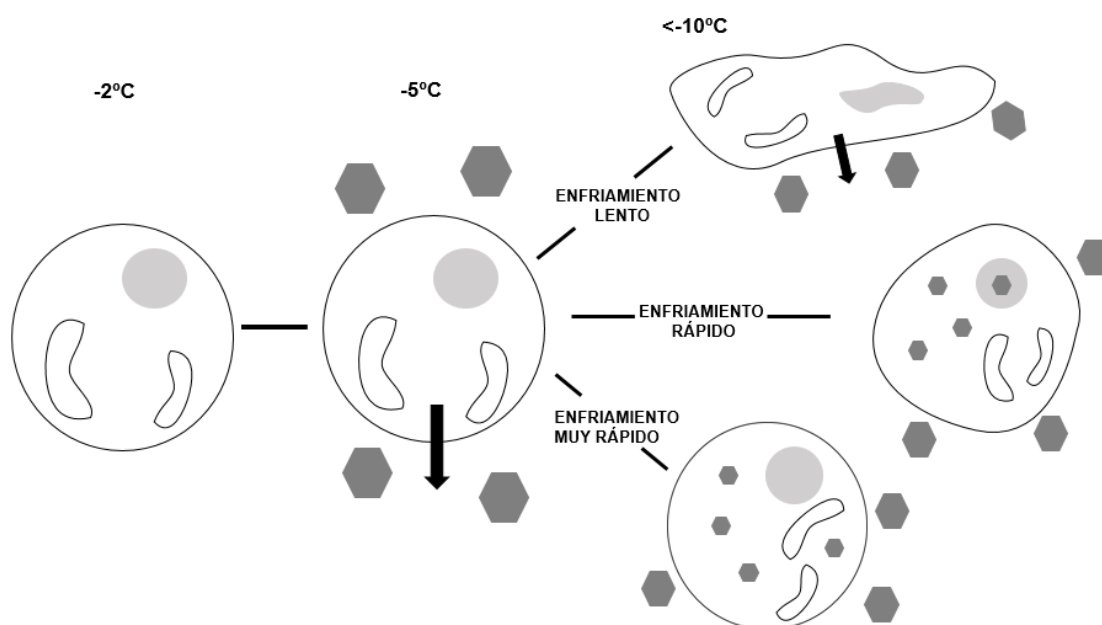


Figura 2 Esquema de eventos físicos en la célula durante la congelación. Los hexágonos grises representan cristales de hielo (Adaptado de Mazur, 1985).

El descenso térmico también tiene efecto sobre las estructuras celulares, cada paso en el proceso de criopreservación produce un estrés celular que puede llegar a causar un daño parcial o total del espermatozoide (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995). Los espermatozoides sujetos a la criopreservación son muy sensibles a la reducción brusca de la temperatura, es así, que tiene mucha importancia la velocidad a la que ocurre el descenso térmico (Watson, 1995).

Durante la descongelación se reproducen inversamente los procesos de supercooling y el de solución. El entorno del espermatozoide comienza a descongelarse a medida que se incorporan moléculas de agua, que a su vez comienzan a ingresar al interior de la célula para balancear osmóticamente los dos compartimentos con el posterior aumento de volumen celular (Fiser y Fairfull, 1989).

El "Shock térmico" es la principal fuente de producción de daños a las membranas biológicas, que se pueden resumir en: pérdida de la permeabilidad

selectiva y de la integridad de la membrana plasmática (Pellicer-Rubio, Magallon, Combarnous, 1997), liberación de enzimas intracelulares (Blackshaw y Salisbury, 1957; Harrison y White, 1972; Mann y Lutwak-Man, 1955) y lípidos (Blackshaw y Salisbury, 1957; Darin-Benett, Poulos y White, 1973), en la redistribución de iones (Quinn, White y Cleland, 1969), cambios en la membrana del acrosoma (Jones y Martin, 1973; Watson y Martin, 1972) y de las mitocondrias (Watson, 1995), pérdida de motilidad (Nunes, Corteel, Combarnous y Baril, 1982) y disminución de la actividad metabólica (Salisbury y VanDemark, 1945).

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos más concentrados en la fase líquida. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a esta diferencia de gradiente, la célula se deshidrata (Boiso, 2001). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva momentáneamente la temperatura de la solución, y la disminución rápida de la temperatura resulta perjudicial para la célula (Boiso, 2001). Las membranas se desestabilizan en la etapa de congelación, por efecto de las bajas temperaturas y la exposición a altas concentraciones salinas, y esto tiene como resultado una degeneración post descongelación, al combinarse nuevamente con efectos letales de naturaleza térmica y osmótica (Holt y North, 1994). Cuando una solución se enfría por debajo del punto de congelación, los cristales de hielo se nuclean y el agua pura se cristaliza formando hielo. Los solutos desplazados permanecen disueltos en la fracción de agua líquida incrementando la presión osmótica. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada. En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido (Stornelli et al., 2005; Watson, 2000). Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15-60 °C / min, lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevivencia celular. Conociendo la permeabilidad hídrica celular y su activación energética podría predecirse la máxima tasa de enfriamiento compatible con el equilibrio osmótico y entonces determinar protocolos óptimos de criopreservación (Stornelli et al., 2005). Las diferencias entre poblaciones espermáticas entre especies y en un eyaculado simple se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos, así como su susceptibilidad a la injuria por frío (Hammerstedt y Parks, 1987). A pesar de que optimicemos el proceso de criopreservación y minimicemos el riesgo de muerte celular, una parte de la población celular no es capaz de sobrevivir. Por lo que es necesario concentrarse en la funcionalidad de la población superviviente (Katkov, Katkova, Crister y Mazur, 1998).

5. Tratamiento de semen post descongelado

Se sabe que la criopreservación es muy perjudicial para la función de los espermatozoides (Watson, 1981). La crioinjuria espermática incluye la inducción prematura de un estado similar a la capacitación (Bailey, Bilodeau, Cormier, 2000). Se ha demostrado que el plasma seminal tiene la capacidad de prevenir y revertir lesiones causadas por los procesos de congelación y descongelación, ocasionando una mejora en sus parámetros de calidad (Maxwell et al., 2007).

La adición de plasma seminal luego de la descongelación del semen, aumentó la resistencia de los espermatozoides al choque por frío (Barrios, Fernandez-Juan, Muiño blanco y Cebrián-Perez, 2005) y los efectos nocivos de la criopreservación (El-Hajj, Gillan, Thomson, Evans y Maxwell, 2007). Esta adición de plasma seminal a los espermatozoides congelados/descongelados, mejoró la motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y la respiración mitocondrial (Domínguez et al., 2007). Los efectos positivos del plasma seminal se les atribuyen a determinadas proteínas producidas por las vesículas seminales, que se unen a la superficie del espermatozoide (Barrios et al., 2005). El efecto protector se debe a la estabilización de membranas actuando como factores descapacitadores y luego como modificadores de la membrana durante la capacitación, además se relacionan con la protección de los espermatozoides contra el estrés oxidativo y la capacitación prematura (Muiño-Blanco et al., 2008).

No encontramos reportes que hayan evaluado el efecto de medios isoosmóticos a la descongelación del semen, tal como se hace con embriones congelado en glicerol.

6. Diluyentes

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen, a la vez posibilitan el manejo de la concentración previamente establecida de las dosis, acondicionadas en envases adecuados para su posterior uso (Cavestany, 1994). La dilución del semen se realiza por razones tanto técnicas como biológicas. En cuanto a las razones técnicas, en la monta natural se depositan miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra, sin embargo, de este gran número solamente unos 100 a 140 millones atraviesan el cérvix. Cuando se utiliza la IA, el volumen de inseminación y el número de espermatozoides que contiene, se reducen sustancialmente al compararlo con la monta natural. El límite inferior, generalmente aceptado como resultante de un buen índice de fertilización, tras la IA cervical, es de 100 millones de espermatozoides por dosis inseminante, de esta forma se puede inseminar un gran número de hembras con tan solo un eyaculado (Salamon, et al., 1990).

En cuanto a las razones biológicas, los diluyentes adecuados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, un sistema amortiguador de los cambios de pH y un ambiente isotónico. Además, protegen a los gametos del shock de frío y contra las injurias de la congelación, ya que el plasma seminal le proporciona al espermatozoide una protección limitada contra los cambios de temperatura (Salamon, et al.,1990).

Se consideran naturales a los diluyentes a base de leche. La fracción proteica (caseína) de la leche es la responsable de las propiedades protectoras de la leche como diluyente. Dichas propiedades son de efecto buffer ante cambios de pH, agente quelante y proteger los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salamon, et al., 1990). Cualquier tipo de leche que se utilice, debe ser sometida a un previo calentamiento a baño maría, por encima de 92-95 °C por 8 a 10 minutos (no debe hervir), con el fin de inactivar los factores tóxicos de su fracción proteica (Salamon, et al., 1990). Actualmente, por la disponibilidad de leche ultra pasteurizada (UHT), podemos evitar los complicados tratamientos de inactivación que son necesarios para contrarrestar el efecto nocivo de algunos de sus componentes (Jones y Foote, 1972; García y Graham, 1987). Existen otras sustancias naturales que han sido utilizadas para la dilución del semen tales como el aloe vera y la leche de coco (Fernández Abella, Bonilla Riera, Bonilla Riera, Villegas, Ibáñez., 2001).

Los diluyentes sintéticos más comúnmente utilizados, contienen como amortiguador TRIS o citrato; como fuente de energía glucosa o fructosa; y para proteger la membrana espermática del frío la yema de huevo (Maxwell y Salamon, 1993). Los buffers orgánicos (TRIS) tienen una capacidad de amortiguar los rangos de tolerancia de los espermatozoides (pH 6,5-7,5) superior a los buffers inorgánicos (citrato) (Aisen, 2004). Su principal función es la de neutralizar el ácido láctico, producto del metabolismo de los espermatozoides. Estos buffers atraviesan las membranas y también cooperan con el equilibrio interno (Maxwell y Salamon, 1993).

6.1. Medio de mantenimiento (Holding)

El medio de mantenimiento es usado para el mantenimiento en aire atmosférico de embriones bovinos recuperados in vivo, así como para su transferencia. Bovihold® posee una solución buffer (HEPES) que contiene D-Glucosa, Piruvato, BSA, aminoácidos, factores de crecimiento y antibióticos. Este medio puede ser utilizado para mantenimiento y transporte de embriones a temperatura ambiente, y para el lavado de embriones previo a la transferencia a receptoras (Bovihold®, Minitube, Alemania). Es el último medio de recuperación posterior al lavado de embriones congelados en glicerol. Por sus componentes, es también un medio ideal para la recuperación posdescongelado de espermatozoides.

HIPÓTESIS

El tratamiento posdescongelado del semen ovino con medios isoosmóticos con el medio uterino mejoran los parámetros de calidad cinética espermática y la fertilidad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del tratamiento posdescongelado sobre la cinética seminal de la dosis de semen ovino.

Objetivos Particulares

- Comparar in vitro dos medios de tratamiento posdescongelado sobre la cinética espermática del semen ovino congelado.
- Comparar la fertilidad a la IA por vía cervical del semen tratado con un medio isoosmolar con semen sin tratamiento posdescongelado.
- Comparar la fertilidad a la IAIU del semen tratado con el semen sin tratamiento posdescongelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio contó con dos experimentos, uno in vitro con evaluación de la calidad seminal comparando dos tratamientos posdescongelado y otro in vivo con evaluación de la fertilidad de ovejas inseminadas por vía intrauterina y vía cervical con tratamiento del semen posdescongelado.

El experimento in vitro se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal “Dr. Alfredo Ferraris” de Facultad de Veterinaria, CENUR-Litoral Norte ubicado en la “Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni”, km 363 de la ruta 3, Paysandú. El experimento in vivo se realizó en establecimientos privados (Cabaña “El Arazá”, Tacuarembó; Establecimiento “María Inés”, Artigas). Los procedimientos se realizaron bajo el protocolo aprobado por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales (CEUA del CENUR Litoral Norte), protocolo N°1372.

1- Ensayo in-vitro

Se realizó un ensayo para evaluar el efecto del tratamiento posdescongelado con dos medios isoosmóticos, sobre la cinética espermática en la dosis de inseminación.

1.1 Semen

Se utilizaron dosis de semen congelado comercial (0,25 ml) de seis carneros de diferentes razas. La descongelación del semen se realizó en baño maría a 37°C por 40 segundos. Se realizó un pool de dos pajuelas de semen (del mismo lote) para cada carnero en una platina térmica a 37°C.

1.2 Tratamientos

Se realizó un pool con dos pajuelas de semen de cada carnero para la evaluación y se tomaron tres muestras: una muestra control y las dos restantes fueron incubadas posdescongelado en dos medios isoosmóticos. Se tomaron alícuotas de 50 µL de cada pool de semen y fueron incubadas en microtubos sobre platina térmica a 37°C por 10 minutos con igual volumen de uno de los siguientes medios: leche descremada larga vida (tratamiento UHT), o medio de mantenimiento de embriones (BoviHold®, Minitube, Alemania) (tratamiento HOLD). El control (CTRL) se incubó por el mismo lapso de tiempo con 50 µL del mismo diluyente de congelación (TRILADYL, Minitube, Alemania). Previo a homogeneizar los diluyentes con el semen, estos se precalentaron a 37°C en platina térmica.

1.3 Evaluación seminal

La evaluación seminal se realizó mediante un sistema CASA (Androvision®, Tiefenbach, Alemania) utilizando una cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel). Se colocaron 10 µL de cada muestra en la cámara para evaluar cuatro campos preestablecidos en la cámara, totalizando un mínimo de 400 espermatozoides evaluados en total. Los parámetros considerados fueron la concentración (spz/ml), la motilidad total, motilidad progresiva (MP, %, que incluye progresiva rápida, lenta y circular), motilidad local e inmóviles. Se consideraron los parámetros clásicos del CASA; incluyendo las distancias (µm) de la trayectoria circular (DCL), de la línea recta entre el punto inicial y punto final de la secuencia (DSL) y la distancia promedio de la trayectoria circular (DAP) con las respectivas velocidades de las trayectorias curvilínea o VCL, circular o VCL y recta o VSL (µm/s). En base a las velocidades el sistema evalúa los índices de linealidad ($LIN = VSL/VCL$), de rectitud de trayectoria ($STR = VSL/VAP$) y el de oscilación ($WOB = VAP/VCL$), la frecuencia de cruce de la trayectoria promedio (BCF, Hz), y la amplitud promedio del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, µm) (Quintero-Moreno et al., 2003). Para cada muestra de semen se realizaron dos replicados, evaluando en ambos casos CTRL (semen + mismo diluyente de congelación, 1+1 v/v), UHT (semen + UTH, 1+1 v/v) y Holding (semen + HOLD, 1+1 v/v), en cada caso se evaluó a los 5 (T5) y 10 minutos (T10).

2. Ensayo *in-vivo*

La fertilidad posterior a la IA por vía cervical (IAIC) o intrauterina (IAIU) con semen tratado (HOLD) o CTRL fue evaluada por ultrasonografía 55 días posteriores a la IA.

2.1. Inseminación intracervical

2.2 Animales.

Se usaron ovejas de una majada comercial de 2000 ovejas en servicio Merino Dohne en estación reproductiva, se seleccionaron 200 hembras multíparas teniendo en cuenta una condición corporal promedio 3 (establecimiento “María Inés”, S 30°80’- W 57° 24’, Artigas, Uruguay). El trabajo fue realizado desde el 20 de marzo hasta el 1 de abril de 2021.

Dicha técnica fue realizada en todos los animales por el mismo operador. Para el procedimiento se utilizó semen congelado de 4 carneros, de calidad aprobada para su uso (>35% motilidad progresiva, >30 millones de progresivos en la dosis, <20% de patologías totales) (evaluado mediante el sistema CASA), realizándose un pool de los mismos antes de proceder a la inseminación. Las dosis de semen fueron descongeladas a 37°C/40 segundos y vaciadas en tubos de ensayo. Para el semen tratado se adicionó igual volumen de medio HOLD (0,22 mL), se mantuvo a 37°C por 5 minutos y se envasó en pajuelas de 0,25 mL. Para el semen CTRL se adicionó igual volumen de diluyente de congelación (para estandarizar la concentración espermática de la dosis de IA sin variar la osmolaridad del medio de los espermatozoides), y luego de 5 minutos se envasó en pajuelas de 0,25 mL. El procedimiento se realizó con una dosis de 88 millones de espermatozoides progresivos.

La IA se realizó detectando celo natural con capones androgenizados. Las ovejas se presentaron con los cuartos traseros sobre la baranda del tubo. Se introdujo el vaginoscopio en la vagina, y se localizó el orificio de entrada del cérvix. Se introdujo el inyector para pajuela con pipeta punta excéntrica (ref: 17320/0000, 17300/0000; Minitube, Alemania) lo más profundo posible hasta el primer indicio de resistencia, se depositó el semen en el orificio uterino externo. Luego se retiró el vaginoscopio y se liberó la oveja. Se inseminaron aleatoriamente registrando la identificación del animal con el tratamiento de semen utilizado.

2.2. Inseminación intrauterina

Para la inseminación artificial intrauterina (IAIU) se utilizaron 160 ovejas Merino Australiano multíparas con condición corporal promedio 3 (establecimiento “El Arazá”, S-32°39’29”- W-56°17’9”, Tacuarembó, Uruguay). La inseminación se

realizó en dos replicados de 80 ovejas cada uno (28 de enero y el 12 de febrero de 2021). Las ovejas fueron previamente sincronizadas colocando al día 0 esponjas de progesterona (P4), al día 12 se retiraron las mismas y se administró gonadotrofina coriónica equina (eCG, 300 UI), y se realizó la IAIU a las 60 horas. Previo a la IAIU las ovejas se mantuvieron en ayuno durante 12 horas. La IAIU fue realizada por el mismo operario en el total de los animales.

Se utilizó semen de dos carneros Merino Australiano. Se descongeló el semen tal como se describió en IAIC, descargando el semen en tubos de ensayo donde se adicionó igual volumen de HOLD para la incubación por 5 minutos. La mitad de los animales se inseminaron con CTRL y la otra mitad con semen + HOLD incubado 5 min. Las pajuelas se descongelaron secuencialmente para dar tiempo a la incubación del semen entre ovejas. La dosis utilizada en este caso fue de 77 millones de espermatozoides. Para la IAIU, la oveja se colocó en una camilla de inseminación en decúbito dorsal con una inclinación de 45°, se presentó al inseminador con los miembros posteriores hacia arriba. Se realizó la antisepsia de la pared abdominal y se inyectó anestésico local (1 mL de Lidocaína 2%, subcutánea) en los puntos donde se introdujeron los trocates. Se introdujo en la cavidad abdominal un trocar y la cánula a la izquierda de la línea media, a 5 cm de la ubre, cuidando de no perforar ninguna vena visible, de este lado se reemplazó el trocar por el laparoscopio y la entrada de CO₂. Antes de colocar el trocar del lado derecho se insufló con CO₂, lo que facilita la visualización de los órganos internos. Se colocó el trocar del lado derecho y el manipulador de vísceras, con el laparoscopio se visualiza el útero, a través de la cánula del lado derecho, se retiró el manipulador y se introdujo la pipeta de Robertson (ref:23700/2200, Minitube, Alemania) depositando la mitad de la dosis en cada cuerno. Luego del procedimiento, antes de inseminar a la próxima oveja, los trocates, cánulas y laparoscopios fueron colocados en una bandeja con desinfectante. En las incisiones se colocó aerosol antimiasmico y bactericida (Bactrovet Plata, Laboratorios Köning). Luego las ovejas se liberaron en un corral adyacente con sombra y agua.

2.3. Evaluación de fertilidad

A los 55 días de la inseminación se realizó el diagnóstico de gestación transabdominal de las ovejas, tomando datos de la cantidad de fetos encontrados en cada oveja. Luego de realizado el diagnostico de gestación, fueron introducidos los carneros para el repaso.

3. Análisis estadístico

Para el experimento in-vitro, la varianza de las variables independientes fue analizada utilizando la prueba de Tukey-Kramer para comparación de medias, mediante el Proc Glimmix de SAS en caso de distribución gamma, o Proc Mixed de SAS en caso de distribución normal. Las variables de cinética espermática

con distribución normal fueron MP, MPR, VCL, VSL, VAP, DCL, DSL, DAP, ALH, BCF, HAC, WOB, LIN y STR. Las de distribución gama fueron MPL, MC. Los efectos fijos incluidos en el modelo fueron el medio (CTRL, UHT y HOLD), el tiempo de incubación (5 y 10 min) y la interacción entre ellos (tiempo x medio). Los carneros se incluyeron como efecto aleatorio dentro del modelo, ya que se utilizaron pool de semen de los carneros, aunque exista variabilidad entre ellos. Para establecer diferencias significativas tomamos un valor de $p < 0,05$, cuando el p se encuentra entre 0,05 y 0,1 se considera tendencia.

Para el experimento *in-vivo*, los resultados de fertilidad fueron comparados por la Prueba de Chi cuadrado.

RESULTADOS

1. Resultados in vitro

1.1. Motilidad

En la Figura 4 se grafica % de espermatozoides con MP, MPR y MPL; y en la Figura 5 % de espermatozoides con MC. La incubación con HOLD genero un aumento en el valor de MC, no generando diferencias en MP y MPR comparando con CTRL, sin embargo, el valor de MPL disminuyó. Cuando se incubo con UHT se vio una disminución en los valores de MP y MPR; un aumento en el valor de MC; y sin diferencia en MPL.

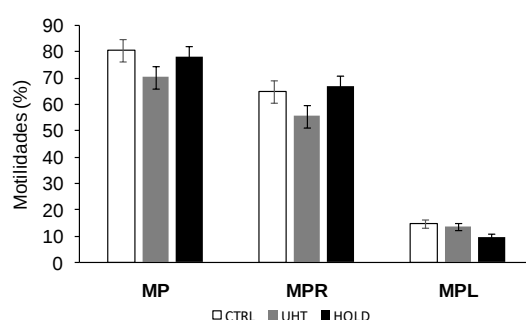


Figura 3 Motilidad progresiva (MP), Motilidad progresiva rápida (MPR) y Motilidad progresiva lenta (MPL) de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio Bovihold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de ningún medio (CTRL).

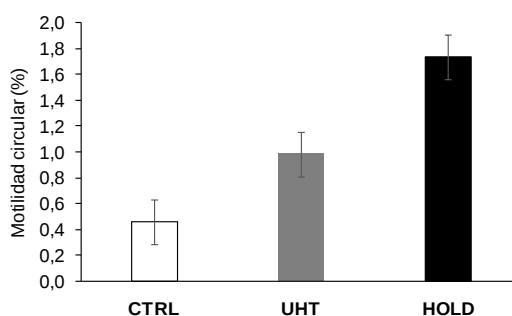


Figura 4 Motilidad circular (MC) de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio Bovihold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de ningún medio (CTRL).

1.2. Velocidad curvilínea

En el análisis de VCL se encontró efecto del medio, mientras que no hubo efecto del tiempo de incubación ni de la interacción tiempo x medio. El agregado de UHT generó que los espermatozoides tuvieran una menor VCL en comparación con el semen CTRL y el tratado con HOLD. En cuanto al semen tratado con HOLD no se encontraron diferencias comparando con el CTRL. El tiempo de incubación no tuvo efecto sobre VCL, es decir que la evaluación a los 5 minutos ya manifiesta el efecto que causa el medio sobre los espermatozoides y no difiere del observado a los 10 minutos (Figura 6).

1.3. Velocidad rectilínea

La velocidad rectilínea de los espermatozoides se ve modificada por el efecto del medio, en cambio, no se modifica por el efecto del tiempo de incubación ni por la interacción tiempo x medio. El agregado del medio HOLD generó que los espermatozoides tuvieran una mayor VSL en comparación con el semen CTRL y semen tratado con UHT. En cuanto al semen tratado con UHT no se encontró diferencia comparando con semen CTRL (Figura 6).

1.4. Velocidad promedio

En la velocidad promedio de los espermatozoides se encontró efecto del medio, pero no hubo efecto del tiempo de incubación ni de la interacción tiempo x medio. El agregado de HOLD generó una mayor VAP de los espermatozoides, comparando con los espermatozoides tratados con UHT y los de semen CTRL (Figura 6).

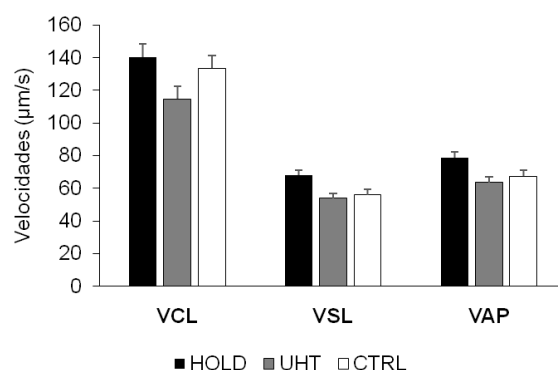


Figura 5 Velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad promedio (VAP) de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) o sin agregar ningún medio (CTRL).

1.5. Distancia de la trayectoria circular

Con respecto a DCL, hubo efecto del medio, mientras que no se encontró efecto del tiempo de incubación ni de la interacción tiempo x medio. El agregado del medio HOLD generó que los espermatozoides tuvieran mayor DCL en comparación con el semen CTRL. En cuanto al semen tratado con UHT no se encontraron diferencias comparado con HOLD ni con CTRL. Incubar 5 o 10 minutos no tuvo efecto sobre DCL (Figura 7).

1.6. Distancia de la trayectoria recta

La DSL recorrida por los espermatozoides fue afectada por el medio de incubación, mientras que no hubo efecto el tiempo de incubación ni la interacción tiempo x medio. La evaluación del semen luego del agregado de medio HOLD y UHT refleja una diferencia significativa frente al semen CTRL, dando como resultado el aumento en la distancia de la trayectoria recta de los espermatozoides. En este caso no hubo diferencias significativas entre incubar con HOLD o UHT (Figura 7).

1.7. Distancia de la trayectoria promedio

La DAP también fue afectada por el medio, aunque el tiempo de incubación no afectó la DAP (5 vs 10 minutos). La interacción tiempo x medio tampoco fue diferente. En la distancia promedio tanto el medio HOLD como el UHT resultaron beneficiosos con respecto al semen CTRL, siendo significativa la diferencia de HOLD y UHT comparado con el CTRL (Figura 7).

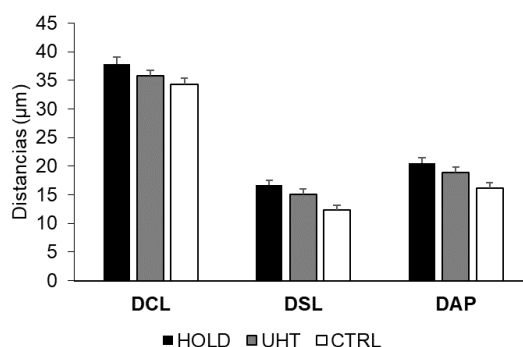


Figura 6 Distancias recorridas de trayectoria circular (DCL), de la trayectoria recta (DSL) y de la trayectoria promedio (DAP) por los espermatozoides con incubación posdescongelado en los medios BoviHold® (HOLD), leche UHT o sin agregar ningún medio (CTRL)

1.8. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza

La ALH fue afectada por la incubación, pero no hubo efecto del tiempo ni de la interacción tiempo x medio. La evaluación del semen luego del agregado de UHT refleja una diferencia significativa frente al semen CTRL y con el agregado de HOLD, dando como resultado un menor desplazamiento lateral de la cabeza en espermatozoides incubados con UHT (Figura 8).

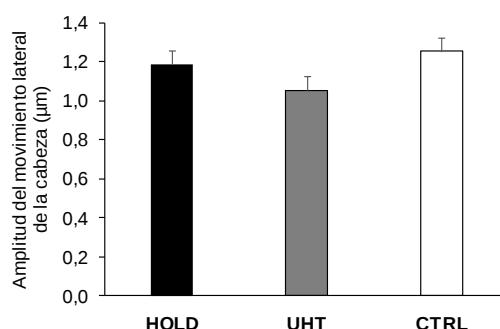


Figura 7 Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides incubados posdescongelado en el control (CTRL), o con el agregado de leche (UHT) o medio Bovihold® (HOLD).

1.9. Frecuencia de cruce de la trayectoria, Hz.

En la figura 9 podemos ver como la BCF fue afectada por el medio de incubación, pero no el tiempo de incubación (5 vs 10 minutos) ni la interacción. Cuando se evaluó el semen luego del agregado de medio HOLD se vio un aumento de BCF de los espermatozoides con respecto al semen CTRL.

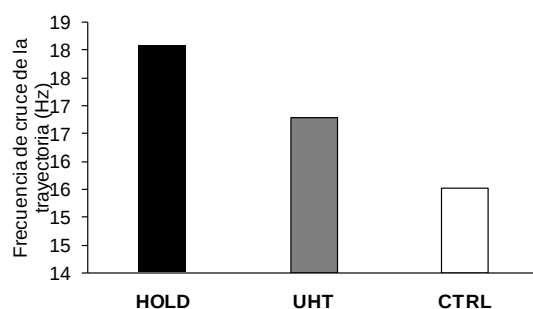


Figura 8 Frecuencia de cruce de la trayectoria de los espermatozoides incubados posdescongelado con medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) o sin el agregado de un medio (CTRL).

1.10. Índice de oscilación

Cuando agregamos un medio al semen se vio efecto sobre WOB. El tiempo de incubación y la interacción tiempo x medio no causaron efecto. La evaluación del semen luego del agregado de medio HOLD y UHT genero un mayor índice de oscilación de los espermatozoides comparado con el semen CTRL (Figura10).

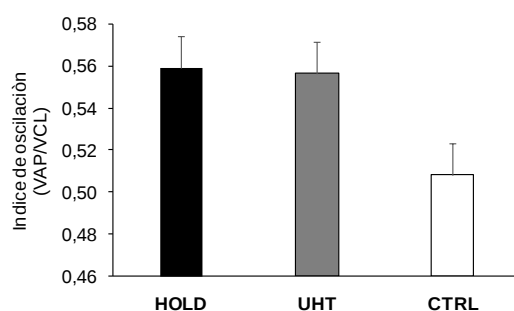


Figura 9 Índice de oscilación de los espermatozoides incubados posdescongelado con el agregado de medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de un medio (CTRL).

1.11. Índice de linealidad

El agregado de medio al semen tuvo efecto sobre LIN, sin efecto del tiempo de incubación ni la interacción tiempo x medio. La evaluación del semen luego del agregado de medio HOLD y UHT genera un aumento del índice de linealidad de los espermatozoides, comparado con el semen CTRL (Figura 11).

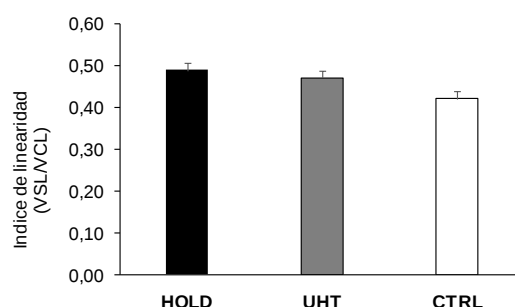


Figura 10 Índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides incubados post descongelado con el agregado de medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de un medio (CTRL).

1.12. Rectitud de trayectoria VSL/VAP

Con respecto a la rectitud de trayectoria de los espermatozoides, la incubación en un medio tuvo efecto, mientras que el tiempo de incubación y la interacción no afectaron significativamente al índice STR. La evaluación del semen luego del agregado de HOLD genero un aumento en la rectitud de la trayectoria de los espermatozoides en comparación con semen CTRL. En cuanto al semen incubado con UHT no tuvo diferencia con el incubado con HOLD ni con el semen CTRL (Figura 12).

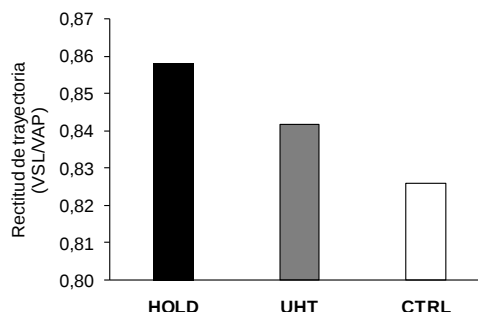


Figura 11 Rectitud de trayectoria (STR) de los espermatozoides incubados posdescongelado con el agregado de medio BoviHold® (HOLD), leche UHT (UHT) y sin el agregado de un medio (CTRL).

2. Resultados in vivo:

2.1. Inseminación intracervical

La fertilidad general medida como preñez por ecografía al día 55 posterior a la IAIC fue de 56,7% (102/180), siendo 58,9% (56/95) la del grupo CTRL vs 54,1% (46/85) en el grupo HOLD ($P>0.05$). Cabe aclarar que se eliminaron 20 ovejas por pérdida de identificación o faltaron a la ecografía.

2.2. Inseminación Intrauterina

La fertilidad general fue de 77,4% (120/155), 77,3% (58/75) la del grupo HOLD vs 77,5% (62/80) en el grupo CTRL (diferencia no significativa). Se aclara que se eliminaron 5 ovejas por pérdida de identificación o faltaron a la ecografía.

DISCUSION

En este estudio, el tratamiento posdescongelado del semen ovino con medios de osmolaridad similar con el medio uterino mejoró los parámetros de cinética espermática, aunque no la fertilidad. Por lo tanto, la hipótesis inicial se confirma parcialmente.

Al tratar el semen posdescongelado 1+1 con medios isoosmóticos permite una transición osmótica entre la que hay en el diluyente de congelación en que se encuentran los espermatozoides y el medio uterino al que pasarán al momento de la IA. Del estudio in-vitro, el tratamiento con medios isoosmóticos mejoró algunos parámetros de calidad seminal.

La incubación con HOLD incrementó los parámetros de velocidades, y por lo tanto las distancias recorridas, la MC, la BCF y los índices de rectitud, linealidad y oscilación de la trayectoria; sin embargo, la diferencia en VCL no fue significativa con el CTRL. El medio UHT fue el de menor velocidad circular, MP, MPR y ALH con respecto al CTRL y HOLD, siendo similar al CTRL para las otras variables. Es posible que la viscosidad haya sido un factor en estos parámetros, pero no fue evaluada en este experimento. A juzgar por los valores obtenidos, HOLD resultó ser un medio que favoreció el desempeño de los espermatozoides in-vitro, y por lo tanto fue el medio que se decidió evaluar en la prueba *in-vivo*.

El estudio de fertilidad por vía cervical resultó en que no hubo diferencias significativas entre CTRL y HOLD. En este estudio se obtuvieron resultados de fertilidad mayores a los publicados para IA con semen congelado por vía cervical, que a nivel nacional oscilan entre 10-40% (Gil, et al., 2002) o en torno al 60% según estudios escandinavos (Olesen, 1993). Sabemos que la fertilidad es una variable que además de afectarse por parámetros espermáticos cualitativos (motilidad, velocidad, distancia recorrida), también se afecta por aspectos cuantitativos de la dosis de IA. Es así que las inseminaciones con dosis críticas son deseables para reflejar *in-vivo* los hallazgos in-vitro. Cuando se usa semen congelado por vía cervical no se deben utilizar dosis menores a 60 millones, generalmente se utilizan dosis superiores a los 120 millones (Gibbons y Cueto, 1995).

En nuestro caso, las inseminaciones por vía cervical se realizaron con 88

millones de espermatozoides progresivos por dosis, lo que posiblemente ocultó el efecto del tratamiento previo a la IA.

Similar a la IAIC, la fertilidad de la IAIU tampoco fue diferente entre CTRL y HOLD, con resultados muy buenos, se puede lograr hasta 60-75% (Bancheva, et al, 2021). En este caso, no esperábamos grandes diferencias ya que la dosis de semen depositada en el lumen uterino fue numéricamente elevada, siendo este aspecto de la dosis más relevante para las IA cervicales que para las intrauterinas. Para IAIU se utiliza una dosis de 50-100 millones de células espermáticas (Fernández Abella, 2015).

Se ha descrito que el proceso congelación-descongelación tiene un efecto negativo en la integridad y la funcionalidad de la membrana espermática. Esta membrana es fundamental para el metabolismo espermático y para varios procesos involucrados con la fecundación (Manjunath y Therien, 2002). Para disminuir los efectos indeseables causados por la criopreservación es que se han evaluado aditivos en los medios de congelación, así como en los de descongelación espermática.

En este trabajo buscamos una alternativa más constante en cuanto a nivel de calidad, intentando evaluar el efecto del tratamiento post descongelado del semen con medios isoosmóticos (Holding y UHT). La respuesta fue evaluada tomando en cuenta los parámetros de cinética espermática mediante el sistema CASA (in-vitro) y la fertilidad a las inseminaciones mediante el diagnóstico de gestación por ecografía 55 días luego de realizada la última IA.

El VSL se considera siempre el valor de velocidad más bajo para un espermatozoide y generalmente los valores son muy similares al VAP, lo que se mantiene en nuestro experimento. Además, se ha comprobado que los espermatozoides de ovinos con alta fertilidad presentan mayores valores de viabilidad, VCL y VSL que los de ovinos de baja fertilidad (Vicente-Fiel et al., 2005).

Se podría decir que el semen tratado posdescongelado, sería más fértil, ya que los espermatozoides tienen un mayor recorrido y velocidad, lo que le ayudara a atravesar el moco cervical en una inseminación, llegar al óvulo y atravesar la zona pelúcida. Hay trabajos que reportan resultados positivos (aumentando los valores) con el tratamiento del semen con PS, obtenido mediante VA en los siguientes parámetros: DAP, VAP, VCL, VSL, BCF y motilidad progresiva (Rodrigo Parada, 2009).

El aumento del desplazamiento lateral de la cabeza puede relacionarse con etapas tempranas de la capacitación espermática (Aitken, 1995). Un valor muy alto se relaciona con trayectorias irregulares como las que se observan en eyaculados con espermatozoides hiperactivos, superando un valor de 7 μm

(Mortimer, 2000). Esto puede ser perjudicial, porque significa que el espermatozoide tiene menos tiempo para llegar al lugar de la fecundación. La hiperactivación espermática es un fenómeno flagelar, siendo la trayectoria de la cabeza un buen indicador de este movimiento flagelar (de Monserrat Vallvè, 2016).

CONCLUSIONES.

Se concluye que la utilización de medios isoosmóticos para la incubación del semen posdescongelado mejoran los parámetros de cinética espermática. Además, la evaluación del semen incubado por 5 minutos manifiesta el efecto que causa el medio sobre los espermatozoides y no difiere de lo observado a los 10 minutos. Sin embargo, la mejora de los parámetros de cinética espermática no se afectó la fertilidad de las ovejas inseminadas con semen tratado. Sería importante realizar más estudios de inseminación con dosis críticas para evaluar el impacto del tratamiento del semen posdescongelado sobre la fertilidad.

REFERENCIAS

- Aguilar, Z. (2010). *Sincronización de celo e inseminación artificial en ovinos* (Tesis de grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista.
- Aisen, E. (2004). *Reproducción ovina y caprina*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N., y Troedsson, M. H. T. (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*, 127(5), 593-600.
- Aitken, R.J. (1995). Cell biology of human spermatozoa. En J.G. Grudzinskas y J.L. Yovich (Eds.), *Gametes, The Spermatozoa* (pp. 206-237). Cambridge: Cambridge University Press.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., ... de Paz, P. (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, 63(4), 1235-1247.
- Azzarini, M., y Valledor, F. (1988). Inseminación intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural. *Producción Ovina*, 1, 1-8.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., y Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21, 1-7.
- Bancheva, T., Stoycheva, S., Dimitrova, T., y Markov, N. (2021). Natural and artificial insemination in sheep-a review. *Animal Science*, 64(1), 231-239.
- Barrios, B., Fernández, J.M., Muino-Blanco, T., y Cebrian-Pérez, J.A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26, 539-549.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., y Cebrián-Pérez, J.A. (2000). Seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *International Journal of Andrology*, 24, 352-359.
- Bedford, J.M. (1983). Functional significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction*, 31, 143-154.

- Bervejillo, J. y Bottaro, M.P. (2020). Situación y perspectivas de la cadena ovina. En Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, *Anuario Opypa* (pp.61-69). Montevideo: MGAP. Recuperado de <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/anuario2020/anuario2020.pdf>
- Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., y Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet*, 13(2), 25-38.
- Blackshaw, A. W., y Salisbury, G. W. (1957). Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. *Journal of Dairy Science*, 40, 1099-1106.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18, 127 – 131.
- Bravo Marchan, S., y Romero Yáñez, O. (2012). Mejoramiento genético Ovino. En *Fundamentos de la producción ovina en la Región de La Araucanía* (pp. 142-155). Temuco: INIA. Recuperado de <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/7524/NR38526.pdf?sequence=13&isAllowed=y>
- Brogliatti, M. (2008). *Inseminación artificial a tiempo fijo: el porqué de los intentos fallidos*. Recuperado de <https://qpdfs.com/inseminacion-artificial-a-tiempo-fijo-el-porque-de-los-606306.html>
- Bustamante, F.I.C. (2010). *Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen* (Tesis de doctorado). Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10183/23020>
- Campbell, J.W., Harvey, T.G., Mc Donald, M.F., y Sparksman, R.I. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, 45, 1535-1544.
- Cavestany, D. (1994). *Procesamiento y congelación de semen de toro*. Montevideo: Santa Catalina.
- Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., y Anchordoguy, T. J. (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, 27, 219-231.

- Cseh, S., Faig, V. L. y Amridis, S. G. (2014). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 187-192.
- Darin-Benett, A., Polulos, A., y White, I. G. (1973). The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. *Australian Journal of Biological Science*, 26, 1409-1420.
- De Monserrat Vallvé, J. (2016). CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futura. *Educación Continuada en el Laboratorio Clínico*, 32, 82-111. Recuperado de: www.seqc.es/download/tema/14/4437/6279335/3122415/cms/tema-8-casa-analisis-de-semen-automatizado_aplicabilidad-y-tendencias-de-futuro.pdf/
- Domínguez Rebolledo, A., Sierra, L., Tamayo, A., Loria, A., Denis, S., Osés, R., ...Ugalde, J. (2007). Fertilidad en ovejas de pelo inseminadas con semen congelado rediluido con plasma seminal. *Revista Científica (Maracaibo)*, 17, 73– 76.
- Domínguez, M.P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Cesari, A., y Alberio, R.H. (2008). Seasonal variation in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69, 564-573.
- Dun, R.B. (1955). The cervix of the ewe; its importance in artificial insemination of sheep. *Australian Veterinary Journal*, 31(4), 101-103.
- Durán del Campo, A. (1980). *Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Economía.uy. (2022). *Ovinos en Uruguay. Lanas, carnes y cueros*. (2022). Recuperado de <https://www.economiauy.net/ovinos-en-uruguay/#:~:text=La%20cr%C3%ADa%20de%20animales%20ovinos,de%20la%20Colonia%20del%20Sacramento>
- El-Alamy, M. y Foote, R. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 65, 245-254.
- El-Hajj Ghaoui, R., Gillan, L., Thomson, P.C., Evans, G., y Maxwell, W.M. (2007). Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28, 109–22.

- Eppleston, J., y Maxwell, W.M.C. (1993). Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix (review). *Wool Techonology and Sheep Breeding*, 41, 291-302.
- Evans, G., y Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney: Butterworths.
- Faigl, V., Vass, N., Javor, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G. y Cseh, S. (2012). Artificial insemination of small ruminants - A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115-29.
- Fernández Abella, D., Bonilla Riera, C., Bonilla Riera, R., Villegas, N., y Ibáñez, W. (2001). Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5°C sobre el transporte espermático. *Producción Ovina*, 14, 55-63.
- Fernández Abella, D.H. (2015). *Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Fiser, P.S., y Fairfull, R.W. (1989). The effects of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26, 64-69.
- Foote, R.H. (1984). Buffers and extenders. What do they do? Why are they important? En *Proceeding Technical Conference on AI and Reproduction* (Vol.10, pp. 62-73). Columbia: NAAB.
- Foote, R.H., y Parks, J.E. (1993). Factors affecting preservation and fertility of bull semen: a brief review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5, 665-673.
- Fukui, Y., y Roberts, E.M. (1977). Sperm transport after non-surgical intrauterine insemination with frozen semen in ewes treated with prostaglandin F2a. *Journal of Reproduction and Fertility*, 51, 141-143.
- Gao, G.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., y Crister, J.K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49, 112-123.
- Garner, D.L., y Hafez, E.S.E. (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. En E.S.E. Hafez, y B. Hafez (Eds.), *Reproduction in farm animals* (7ª ed., pp. 96-109). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gibbons, A., y Cueto, M. (1995). *Manual de Inseminación Artificial en la Especie Ovina*. Bariloche:

- Gibbons, A., y Cueto, M. (2008). *Manual de inseminación artificial en la especie ovina*. Bariloche: INTA.
- Gil, J., Rodríguez-Irazoqui, M., Soderquist, L., y Rodriguez-Martinez, H. (2002). Influence of centrifugation or low extension rates pre-freezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*, 57, 1781-1792.
- Gil, J., y Olivera, J. (2005). Preservación (refrigeración y congelación) de semen ovino y su uso en inseminación artificial cervical. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XXXIII, pp. 55-67). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Gwathmey, T.M., Ignatz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P., y Suarez, S.S. (2006). Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct¹. *Biology of Reproduction*, 75, 501-507. Recuperado de <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2629062/Bovine>
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Sharpe, P., y Buckrell, B.C. (1990). Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology* 33, 1231–1243.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., y Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.
- Hammerstedt, R.H., y Parks, J.E. (1987). Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34, 133-149.
- Harrison, R. A. P. y White, I. G. (1972). Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram and their leakage after cold shock. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30, 105-115.
- Holt, W.V. (2000). Basic aspect of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 3-22.
- Holt, W.V., y North, R.D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91, 451- 461.
- Holt, W.V., y North, R.D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 51(3), 414-424.

- Instituto Nacional de Carnes. (2021). *Stock bovino y ovino. Existencias al 30 de junio*. Recuperado de <https://www.inac.uy/innovaportal/v/4714/10/innova.front/serie-anual-stock---bovinos-y-ovinos-por-edad>
- Jones, R.C., y Foote, R.H. (1972). Nondialyzable skim milk in diluents for ram and bull semen. *Journal of Dairy Science*, 55, 856-861.
- Jones, R.C., y Martin, I.C.A. (1973). The effect of dilution, egg yolk and cooling to 5°C in the ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35, 311-320.
- Katkov, I.I., Katkova, N., Crister, J.K., y Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37, 325-338.
- Kelly, V.C., Kuy, S., Palmer, D.J., Xu., Z., Davis, S.R., y Cooper, G.J. (2006). Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, 6, 5826-5833.
- Lamirande, E. de, Leclerc, P., y Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 3, 175-194.
- Leahy, T., y Gadella, B.M. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal of Andrology*, 17, 561-567
- Leibo, S.P., y Bradley, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. En C. Gagnon (Ed.), *The male gamete* (pp. 502-517). Vienna: McGill University.
- López, A., Regueiro, M., Espasandin, A., y Pérez-Clariget, R. (2010). Efecto del agregado de plasma seminal de toro o de carnero sobre la fertilidad obtenida con semen ovino almacenado a 5°C. *Agrociencia*, 14(3), 151. Recuperado de <https://agrocienciauruguay.uy/index.php/agrociencia/article/view/816>
- López Pérez, A., y Pérez-Clariget, R. (2012). Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored a 5°C for 24 hours. *Theriogenology*, 77, 395-399.
- Manjunath P, Therien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipids binding proteins in sperm membrane lipids modification that occurs during capacitation. *Journal Reproduction Immunology*, 53, 109-119.

- Manjunath P, Lefevbre J, Wright W. (2009). New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biology Reproductive* 80: 394-397.
- Mann, T., y Lutwak-Mann, C. (1955). Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa. *Archives of Biological Sciences*, 93, 578-588.
- Maxwell, W.M, y Salamon, S. (1993). Liquid Storage of Ram Semen. A Review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5, 613-638.
- Maxwell, W. M.C, de Graaf, S. P., Ghaoui, R., y Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 64, 13.
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S. T., Gillan, L., Gellatly, E. S., y McPhie, C. A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(2), 123-126
- Maxwell, W.M.C., y Johnson, L. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates; the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52, 1353-1362.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells. Mechanism and implications. *American Journal of Physiology*, 147, 125- 142.
- Mazur, P. (1985). Basic concepts in freezing cells. En L.A. Johnsson y K. Larsson (Eds.), *Proceedings International Conference on deep freezing of boar semen* (Vol.1, pp. 91-111). Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Mazur, P., Leibo, S. P., Farrant, J., Chu, E. H. Y., Hanna, M. G. JR., y Smith, L. H. (1970). Interaction of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cell. En G. E. W. Wolstenholme y M. O' Connor, *The Frozen Cell* (pp.69-88). London: Churchill.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Crispo, M., de Castro, T., y Rubianes, E. (2009). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* ,22, 113–118.
- Mortimer, S.T. (2000). CASA-Practical aspects andrology lab corner. *Journal Andrology*, 21, 515-24.
- Mortimer, S.T., y Maxwell, W.M.C. (2004). Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, 127, 285-291.
- Moura, A.A, Chapman, D., y Killian, A. (2007). Comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, 98,169-188.

- Moura, A.A., Koc, H., Chapman, D.A., y Killian, G.J. (2006). Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *Journal of Andrology*, 27, 201-211.
- Muiño-Blanco, T., Perez-Pe, R., y Cebrian-Perez, J.A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction Domestic Animal*, 43, (Suppl. 4),18–31.
- Nunes, J., Corteel, J.M., Combarous, Y., y Baril, G. (1982). Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoids de bouc. *Reproduction, Nutrition and Development*, 22, 611-620.
- Olesen, I. (1993). Effects of cervical insemination with frozen semen on fertility and litter size of Norwegian sheep. *Livestock Production Science*, 37, 169–184.
- Olivera, M., Agr, S., Ruiz, T., Tarazona, A., y Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19,426-436.
- Parada, R. (2009). *Tratamientos posdescongelado del semen de carnero. Efecto de diferentes fracciones del plasma seminal sobre la cinética espermática* (Tesis de grado). Facultad de veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Pellicer-Rubio, M. T., Magallon, T., y Comarnous, Y. (1997). Deterioration of goat sperm Vitality is due to a bulbourethral 60kD glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of Reproduction*, 57, 1023-1031.
- Pérez-Pé, R., Barrios, B., Muiño-Blanco, T., y Cebrian, J. (2001). Seasonal difference in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, 760, 113-121.
- Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: A review. *Behavioral Ecology and Socio Biology*, 60, 289-310.
- Quinn, P.J., White, I.G., y Cleland, R.W. (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal of Reproductive and Fertility*, 18, 209 – 220.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., y Rodríguez-Gil, J.E. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59,1973-1990.
- Rego, J.P.A., Crisp, J.M., Moura, A.A., Nouwens, A.S., Li, Y., Venus, B., ...McGowan, M. R. (2014). Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science*, 148,1-17.

- Rodríguez, M., Vallejo, A., Batista, P., y Espasandin, A. C. (2011). Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. *Cangüé*, (31), 44-50.
- Rodríguez-Villamil, P., Hoyos-Marulanda, V., Martins, J. A. M., Oliveira, A. N., Aguiar, L. H., Moreno, F. B., ... Moura, A. A. (2016). Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology*, 85, 540-554. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.044>
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C., y Evans, G. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia.
- Salamon, S., y Maxwell, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen. 2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38, 1–36.
- Salamon, S., y Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
- Salisbury, G.W., y VanDemark, N.L. (1945). Stimulation of livability and glycolysis by addition of glucose to the egg yolk citrate diluents for ejaculated semen. *American Journal of Physiology*, 143, 692-697.
- Sánchez-Luego, S., Aumuller, G., Albrecht, M., Sen, P., Heinrich Rohm, S., y Wilhelm, B. (2004). Interaction of PDC-109, the Major Secretory Protein From Bull Seminal Vesicles, With Bovine Sperm Membrane Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Andrology*, 25, 234-244.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone, C. A., y Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25, 28-35. Recuperado de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11180/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Troedsson, M. H. T., Desvouses, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., ... Bui, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 171-186.
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Fantova, E., Quintín-Casorrán, F.J., Sevilla-Mur, E., y Yániz, J.L. (2014). In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Animal Reproduction Science*, 146(1-2), 15-20.

- Wassarman, P.M., Jovine, L., Litscher, E.S., Qi, H., y Williams, Z. (2004). Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 115, 57-60.
- Watson, P.F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62, 483–492.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 781-791.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen *Animal Reproduction Science*, 60, 481-492.
- Watson, P.F., y Duncan, A.E. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*, 25, 131-142.
- Watson, P.F., y Martin, I.C. (1972). A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 28, 99-101.