

**PRESERVACION DE SEMEN DE CARNERO A 5°C CON DIFERENTES DILUYENTES PARA LA IA EN MAJADAS DEL PROYECTO MERINO FINO: RESULTADOS IN VIVO E IN VITRO****Fierro, S.¹; Gama, S.¹; Gil, J.²; Olivera, J.³**¹ Estudiantes en Tesis. Facultad de Veterinaria. Uruguay. safierro@adinet.com.uy² Área Reproducción. Laboratorio Regional Paysandú «M. C. Rubino», Uruguay.

jujogil@adinet.com.uy

³ Dpto. Ovinos, lanas y caprinos. Facultad de Veterinaria. Paysandú. Uruguay.

joliveram@adinet.com.uy

RESUMEN

Se evaluaron en laboratorio 11 diluyentes en base a leche para preservar semen de carnero a 5°C por 12, 24, 48 y 72 horas. Cinco de ellos fueron seleccionados para evaluarse a campo (IA cervical) tras 24 horas de preservación. Todos los tratamientos de semen preservado obtuvieron menor fertilidad que el grupo control (diluido sin preservación). No hubo diferencias significativas entre los diluyentes UHT-5% yema-2% glicerol, UHT-5% yema, INRA-5% yema-2% glicerol, INRA-5% yema en los resultados de IA. A pesar de que el diluyente FISER-20 % yema no presentó diferencias de fertilidad con el UHT-5% yema, su comportamiento fue significativamente menor con respecto al resto de los diluyentes evaluados a campo.

SUMMARY

Eleven extenders for ram semen preservation at 5°C were assessed in-vitro. Five extenders were selected for evaluation under field conditions after 24 hours at 5°C. All the extenders showed lower fertility than control group (fresh diluted semen). No significant difference was found between extenders UHT-5% yolk-2 % glycerol, UHT-5% yolk, INRA-5% yolk-2 % glycerol and INRA-5% yolk. FISER-20% yolk extender had not statistical difference in fertility with UHT-5% yolk; however it showed lower fertility compared with all the others extenders tested in-vivo.

INTRODUCCION

La preservación del semen de carnero posibilita mantener su fertilidad a lo largo del tiempo, permitiendo el transporte desde el sitio de extracción a otro distante de inseminación. De ésta manera, se elimina el riesgo sanitario implícito de transportar al reproductor.

MATERIALES Y METODOS

El ensayo contó de dos fases.

Fase-I (estudios «in- vitro»): **Diluyentes:** Se procedió a la preparación de once diluyentes (tratamientos) en base

a leche: 1) Leche Descremada UHT (UHT), 2) UHT + 5% yema de huevo de gallina (UHT-5Y), 3) UHT + 2% glicerol (UHT-2G), 4) UHT + 5% yema + 2% glicerol (UHT-5Y2G), 5) Diluyente Fiser (FISER, Fiser y Langford, 1981), 6) Fiser + 5% yema (FISER-5Y), 7) Fiser + 20% yema (FISER-20Y), 8) INRA-96((INRA, IMV Technologies; L'AIGLE, France), 9) INRA 96(+ 5% yema (INRA-5Y), 10) INRA 96(+ 2% glicerol (INRA-2G), 11) INRA 96(+ 5% yema + 2% glicerol (INRA-5Y2G). Los diluyentes preparados fueron suplementados con antibióticos (100.000 UI penicilina sódica + 100 mg estreptomycinina cada 100 ml). Todos los diluyentes se congelaron (-20°C) en alícuotas hasta su utilización.

Semen: El semen se obtuvo de seis carneros Merino Australiano adultos por medio de vagina artificial. Se colectaron dos eyaculados diarios de cada carnero (minimizando así la variación entre eyaculados; Windšor, 1997) y se evaluaron (volumen, color, aspecto, motilidad macro y microscópica). Se determinó la concentración espermática con fotómetro (Spermacue (, Minitub. Landshut, Germany). Se realizó un pool de semen (minimizando así la variación entre machos), aportando cada carnero igual cantidad de espermatozoides. El pool de semen final se dividió en once alícuotas, y se diluyó paulatinamente en cada diluyente hasta una concentración final de inseminación fue de 120 x10⁶ spz por dosis. El semen así diluido se envasó en pajuelas anaeróbicas de 0.25 cc (IMV, Francia; cod. 006937). Se procedió a un enfriamiento paulatino hasta 5°C durante su traslado al laboratorio, en un tiempo aproximado de 1.5 a 2 horas. A nivel de laboratorio se evaluaron en los espermatozoides: motilidad subjetiva a 38°C, integridad de membrana (Garner y Johnson, 1995), y estado de capacitación (Gil et al., 2000). Para cada tratamiento estos parámetros fueron observados en 5 momentos: 0, 12, 24, 48 y 72 horas post enfriado a 5°C.

Fase-II (estudios «in-vivo»): Los protocolos utilizados en esta fase fueron los que obtuvieron mejor comportamiento en la Fase 1, el diluyente que presentó mayores diferencias y un grupo control: 1) UHT (control sin preservación), 2) UHT-5Y, 3) UHT-5Y2G, 4) INRA-5Y, 5) INRA-5Y2G, 6) Fiser-20Y. La obtención y manejo del semen fue la misma que en la Fase-I. Se inseminó vía cervical con pistola y vaginoscopio Walmur(r) un número similar de ovejas en celo natural por día (11 días en total) y protocolo (6 en total), totalizando 150 ovejas por protocolo. La dosis de inseminación utilizada fue en todos los casos 120 x10⁶ de espermatozoides, contenidos en un volumen efectivo de inseminación de 0.2 cc. A los 30 días de la última IA se realizó ecografía transrectal (Aloka 500, Japón). Los resultados de fertilidad fueron comparados por medio del test de Chi- cuadrado de Fisher.



RESULTADOS Y DISCUSION

a) Estudios in-vitro: Respecto a la variable motilidad espermática subjetiva en el período 0-48 h, se observa que los tratamientos UHT-5Y2G, INRA-5Y2G e INRA-5Y tuvieron un comportamiento significativamente superior a lo largo del tiempo que los tratamientos FISER, FISER-20Y e INRA-2G ($P < 0.05$) (Cuadro 1). En el período de preservación 0-72 h los protocolos UHT-5Y2G, INRA-5Y2G, UHT-2G, UHT-5Y e INRA-5Y tuvieron un comportamiento significativamente superior que los protocolos FISER, FISER-20Y, INRA-2G ($P < 0.05$).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pace & Graham (1974), donde determinan que ningún diluyente proveerá de protección a la célula espermática ante el enfriamiento en ausencia de yema de huevo. No obstante su utilización tanto en bajo como en alto porcentaje debería ser evitada (Smith et al, 1978).

Cuadro 1: Motilidad subjetiva en los diferentes protocolos evaluada en dos períodos de tiempo (media de mínimos cuadrados \pm ee) a, b: $P < 0.05$

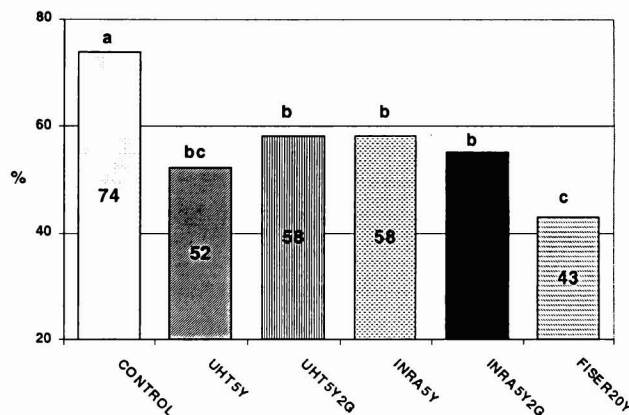
Protocolo	Motilidad subjetiva (0-48 h)	Motilidad subjetiva (0-72 h)
FISER	55.7 \pm 2.4 ^b	49.0 \pm 2.5 ^b
UHT	66.3 \pm 2.2	57.2 \pm 2.3
UHT 5Y	66.1 \pm 2.2	58.6 \pm 2.3 ^a
UHT 2G	65.2 \pm 2.2	58.7 \pm 2.3 ^a
UHT 5Y2G	69.9 \pm 2.2 ^a	61.9 \pm 2.3 ^a
FISER 5Y	63.6 \pm 2.2	55.3 \pm 2.3
FISER 20Y	60.2 \pm 2.2 ^b	53.6 \pm 2.3 ^b
INRA	64.7 \pm 2.2	57.1 \pm 2.3
INRA 5Y	66.8 \pm 2.2 ^a	58.4 \pm 2.3 ^a
INRA 2G	59.9 \pm 2.2 ^b	54.3 \pm 2.3 ^b
INRA 5Y2G	67.3 \pm 2.3 ^a	59.9 \pm 2.4 ^a

La proporción de espermatozoides cuya membrana estaba intacta decreció con el tiempo de preservación. Respecto al estado de capacitación, en este estudio se observó un descenso de los espermatozoides no capacitados tras las primeras evaluaciones en el tiempo, con un aumento relativo al final de las evaluaciones debido a que los espermatozoides ya capacitados desaparecen de la población de espermatozoides evaluados. Aunque no se conoce el grado de importancia que cada uno de los diferentes parámetros espermáticos tiene, sí se sabe que la evaluación de más de uno fortalece el criterio de selección de tratamientos más favorables para la preservación (Amann, 1989). **b) Estudios in-vivo:** Los resultados de fertilidad obtenidos a 30 días por medio de ecografía transrectal se presentan en la figura 1.

Se observa que la fertilidad del tratamiento Control fue significativamente superior a todos los protocolos con semen preservado a 5°C por 24 h utilizados ($P < 0.05$). La fertilidad promedio de los tratamientos de preservación fue de 53.6%. Dentro de estos, el UHT-5Y2G, INRA-5Y e INRA-5Y2G presentaron una fertilidad significativamente mayor que el protocolo FISER-20Y ($P < 0.05$). El UHT-5Y

tuvo un comportamiento intermedio entre estos grupos ($P > 0.05$)

FIGURA 1: Fertilidad a la ecografía 30 días post IA.



índices diferentes $P < 0.05$

Los resultados obtenidos en los estudios in-vitro fueron confirmados en la fase in-vivo. Aquellos diluyentes con un mejor comportamiento en las evaluaciones de laboratorio fueron los que presentaron luego una mayor fertilidad a campo. Esto confirma la buena correlación reportada (Amann, 1989) entre algunas pruebas de predicción de fertilidad y lo que ocurre realmente a campo. Queda así confirmada la importancia de algunos aditivos, como la yema de huevo y el glicerol, para mejorar la calidad biológica del semen preservado a 5°C. También se comprobó un sinergismo entre ellos, coincidiendo con trabajos realizados por Pace & Graham (1974), siendo recomendable el uso combinado de ambos aditivos para mejorar los resultados, v.g diluyente UHT-5Y2G.

El diluyente Fiser-20Y no arrojó los resultados reportados en otros estudios nacionales pero realizados con ovejas sincronizadas (esponjas de MAP) e inseminadas a tiempo fijo (Fernández Abella et al., 1998). Otra posible explicación reside en el tipo de acondicionamiento usado en nuestro trabajo (anaerobiosis), la cual favorecería más intensamente a los diluyentes en base a leche descremada UHT o en base a INRA-96.

CONSIDERACIONES FINALES

La preservación del semen de carnero a 5°C en condiciones anaeróbicas es una tecnología aplicable en condiciones extensivas para la IA vía cervical, posibilitando el uso de semen de carneros valiosos que de otro modo no podrían ser usados a distancia. A pesar de la relativa caída de la fertilidad, se identifican diluyentes que favorecerían los resultados a campo tras la preservación por 24 horas a 5°C.

AGRADECIMIENTOS

A la flia. Filliol Barreiro y personal del establecimiento «Piedra Mora». Al Dr. Gustavo Decuadro-Hansen (IMV Technologies). Trabajo financiado por la Universidad de la República y CSIC (Proyecto 600/610).



BIBLIOGRAFIA

Amann, RP. 1989. Can fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl*, 10:89-98.

Decuadro-Hansen, G.; Magistrini M.; Batelier F. 2001. El INRA 96, un diluyente de conservación de semen de padrillo a 4 y 15°C destinado a la inseminación artificial. Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Montevideo, 2001.

Fernández Abella, D.; Villegas, N.; Bellagamba. 1998. Comparación de la fertilidad obtenida con semen ovino conservado a 5°C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. *Producción Ovina SUL* 11: 51-62.

Fiser, P.S. and Langford, G.A. 1981. The effect of Sodium Pentobarbital and storage time on preservation of ram spermatozoa motility at 5 °C. *Canadian Journal of Animal Science*. 61: 847-851.

Garner, D. and Johnson, L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology Reproduction*. 53:276-284.

Gil J, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 52:93-108.

Pace, M.; Graham, F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Of Animal Science* 39: 1144-1149.

Windsor, DP. 1997. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination in Merino ewes. *Anim Reprod Sci*, 47:21-29.