

EFFECTO DE DOS DILUYENTES PARA CONSERVACIÓN DE SEMEN REFRIGERADO Y DEL MOMENTO DE INSEMINACIÓN SOBRE LA FECUNDIDAD OVINA

Daniel Fernández Abella,^{1,2} Yvon Guérin³, Silvia Sterla⁴,
Oscar Irabuena⁴ y Jean Louis Dacheux³.

RESUMEN

Fernández Abella D., Guérin, Y., Sterla, S., Irabuena, O., Dacheux, J.L. 2006. Efecto de dos diluyentes para conservación de semen refrigerado y del momento de inseminación sobre la fecundidad ovina. Producción Ovina (18): 41 - 47.

En dos otoños consecutivos y en tres predios, se evaluó la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad en un total de 761 ovejas adultas de la raza Corriedale, sincronizadas con esponjas impregnadas con 60 mg de MAP (acetato de Medroxiprogesterona) más 300 U.I. de gonadotropina coriónica equina (eCG) al retirar las esponjas. Se comparó semen fresco *versus* semen refrigerado utilizando dos diluyentes (INRA y Fiser modificado), en dos momentos de inseminación (48 y 55 horas de retiradas las esponjas) y el agregado de Pentoxifilina 20 minutos antes de comenzar la inseminación en una concentración final de 2,4 mM. Las ovejas fueron inseminadas una única vez. Se observó una mayor fecundidad ($P < 0.05$) del semen fresco respecto a el semen refrigerado, explicada esta diferencia a una mayor fertilidad. No se observaron diferencias, según la metodología utilizada: diluyente INRA 83 (método de inseminación francés) y el diluyente Fiser (método nacional de inseminación cervical). No se encontraron diferencias en el momento de realizar la inseminación (48 *versus* 55 horas después de retiradas las esponjas). El uso de la pentoxifilina no determinó cambios ni en fertilidad, ni en la fecundidad. Sin embargo, se observó "*in vitro*" una mejora en la motilidad espermática evaluada microscópicamente. Se observaron variaciones en los resultados debidas al predio y al efecto año. En nuestras condiciones, utilizando semen refrigerado es posible alcanzar valores del 40-50% de fecundidad con una sola inseminación cervical.

Términos clave: conservación de semen, fertilidad, fecundidad, pentoxifilina.

¹ Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), Rbla Baltasar Brum 3764, Montevideo 11800, Uruguay. E-mail: ferabe@sul.org.uy

² Dpto. de Producción Animal y Pasturas, Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto. 50009., Uruguay.

³UMR INRA – CNRS. Centre TOURS. Equipe Gamète Mâle et Fertilité. Nouzilly 37380. France.

⁴Laboratorio de Inmunología. Facultad de Química. Universidad de la República. Regional Norte. Salto. Uruguay.

SUMMARY

EFFECT OF TWO EXTENDERS FOR THE CONSERVATION OF CHILLED SEMEN AND INSEMINATION TIME ON SHEEP FECUNDITY

Fertility, prolificidad and fecundity were evaluated in 761 mature Corriedale ewes. The ewes were oestrus synchronized with sponges containing 60 mg of Medroxyprogesterone acetate (MAP) and injected with 300 U. I. of eCG at sponge removal. Fresh semen was compared versus chilled semen using two extenders: (INRA and modified Fiser), at two insemination moments (48 and 55 hours after sponge removal) and the addition of pentoxifylline 20 minutes prior to insemination at a final concentration of 2, 4 mM. Higher fecundity was observed ($P < 0.05$) with fresh semen compared to chilled semen. The difference was explained by the higher fertility. No differences were observed, according to the methodology used: INRA 83 extender (French insemination method) and the Fiser extender (national method of cervical insemination). No differences in the insemination time (48 versus 55 hours after sponge removal) were observed. The use of pentoxifylline did not determine changes neither in fertility, nor in fecundity. Nevertheless an improvement of "in vitro" spermatic motility evaluated microscopically was observed. Variations were observed in the results owed to farm and year effects. In our conditions it is possible to obtain a 40-50% fecundity rate to a single cervical insemination using chilled semen.

Key words: semen conservation, fertility, fecundity, pentoxifylline.

INTRODUCCIÓN

La conservación del semen tiene como premisa poder extender el tiempo entre la colecta del semen y la inseminación de las hembras (Evans y Maxwell, 1987; Gil, 2002). La conservación del semen en forma líquida (refrigerado) disminuye los costos de la congelación, permitiendo el traslado del semen o dilata su utilización en unos días; facilitando las inseminaciones de Pruebas de Progenie o en Centros de Inseminación (Colas, 1983; Guérin, 1990; Fernández Abella *et al.*, 1998; 2004b; Salamon y Maxwell, 2000).

Utilizando semen refrigerado, se ha determinado que momento de inseminación afecta la fertilidad (Fernández Abella *et al.*, 2003). En efecto, la velocidad del transporte espermático del semen refrigerado observada en el tracto genital, es menor a la del semen fresco (Brückner y Kampler, 1984; Fernández Abella *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha observado en distintas especies y verificado en semen ovino congelado, que el agregado de pentoxifilina posdescon-

gelación mejora su fertilidad (Fernández Abella *et al.*, 2004 b).

En este trabajo, los objetivos fueron comparar dos metodologías diferentes de inseminación (francesa y uruguaya) con dos protocolos de conservación de semen refrigerado, con el fin de cuantificarlos. Por otra parte, determinar si la utilización de pentoxifilina en el semen refrigerado mejora la fertilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y animales experimentales

Los ensayos de campo (inseminaciones artificiales) fueron realizados: en el Centro de Investigación y Experimentación "Dr. Alejandro Gallinal" (CIEDAG) (latitud 33°52' latitud sur) perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) y en los establecimientos "Buena Vista" (Minas) y "Nuestra Sra. del Carmen" (Ladrillos), ubicados ambos en el Departamento de Lavalleja. Se utilizó un total de 761 ovejas adultas de la raza Corriedale.

Sincronización del celo

Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas de MAP (60 mg de acetato de Medroxiprogesterona; Synthex®), Laboratorio Universal) mantenidas en la vagina durante 14 días, y se administraron 300 U.I. de eCG (gonadotropina coriónica equina; Novormon®), Laboratorio Universal) al retirar las mismas.

Manejo del semen

Los eyaculados de 4 carneros Corriedale fueron obtenidos por colecta con vagina artificial, y luego de ser mezclados se dividían en dos partes, para ser conservados por dos métodos: **Fiser modificado** (Fernández Abella *et al.*, 1998; con leche descremada UHT y un 15 v/v de yema de huevo) y diluyente **INRA 83**, en base a leche descremada en polvo granulada (Gayelord-Hauser®), reconstituida con agua bidestilada.

La temperatura de conservación del semen fue de 4-5° C para el diluyente Fiser modificado y de 15° C para el diluyente INRA. El semen conservado fue utilizado siempre entre las 24 y 26 horas poscolecta.

Las ovejas fueron inseminadas una sola vez, utilizándose dos metodologías:

* **Francesa**, donde el semen es envasado en pajuelas de 0.25 mL y se inocula con la ayuda de un pistón y una vaina plástica, donde se coloca la pajuela. El cuello uterino se localiza con la ayuda de un espéculo.

* **Nacional**, utilizando una pistola Walmur® y un vaginoscopio para localizar el cuello uterino. El semen diluido en un tubo de ensayo, es aspirado por la cánula de la pistola y depositado en el cuello uterino.

Tratamientos

Ensayo I:

En el mes de Abril (2003) se realizaron 6 tratamientos en dos repeticiones (CIEDAG y predio particular) en 476 ovejas de la raza Corriedale.

Los tratamientos fueron:

1. Inseminación con semen fresco diluido en leche descremada en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.20 mL, a las **55 horas** de retiradas las esponjas (testigo). Entre la colecta y la inseminación transcurrían 90 a 120 minutos.
2. Ídem que anterior (semen fresco diluido), utilizando 220 millones de espermatozoides por dosis.
3. Inseminación con semen refrigerado método INRA 83 en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.20 mL. La inseminación se realizó a las **48 horas** de retiradas las esponjas según metodología francesa.
4. Inseminación con semen refrigerado por el método Fiser modificado en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL. La inseminación se realizó según metodología nacional, a las **48 horas** de retiradas las esponjas.
5. Inseminación con semen refrigerado por el método INRA 83 en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.20 mL. La inseminación se realizó según método francés, a las **55 horas** de retiradas las esponjas.
6. Inseminación con semen refrigerado por el método Fiser modificado, en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL. La inseminación se realizó según método nacional, a las **55 horas** de retiradas las esponjas.

Ensayo II:

Se realizaron 5 tratamientos en dos repeticiones (CIEDAG y predio comercial) en el otoño 2004, utilizando 285 ovejas Corriedale.

- I. Inseminación con semen fresco diluido en leche descremada en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL. La inseminación se realizó según método nacional, a las **55 horas** de retiradas las esponjas (testigo).

- II. Inseminación con semen refrigerado según método INRA 83 en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL. La inseminación se realizó según metodología francesa, a las **48 horas** de retiradas las esponjas.
- III. Inseminación con semen refrigerado por método de Fiser modificado en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL. La inseminación se realizó según método nacional, a las **48 horas** de retiradas las esponjas.
- IV. Inseminación con semen refrigerado según método de INRA 83 en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL, con el agregado de Pentoxifilina (**Ptx**) 20 minutos antes de comenzar la inseminación en una concentración final de 2.4 mM. La inseminación se realizó según método francés, a las **48 horas** de retiradas las esponjas.
- V. Inseminación con semen refrigerado según Fiser modificado, en dosis de 110 millones de espermatozoides en un volumen de 0.10 mL, con el agregado de Pentoxifilina 20 minutos antes de comenzar la inseminación en una concentración final de 2.4 mM. La inseminación se realizó según método nacional, a las **48 horas** de retiradas las esponjas.

Eficiencia reproductiva

Se evaluó la **fertilidad**, como el porcentaje de preñez observado a los 40-45 días pos-servicio por ultrasonografía en tiempo real (Aloka 550, con sonda de 3.5 Mhz). En la misma se determinó la carga fetal, definiéndose la **prolificidad** como el número de fetos por oveja preñada. La **fecundidad** se definió como el producto entre la fertilidad y la prolificidad.

Análisis estadístico

Las diferencias en fertilidad, prolificidad y fecundidad, fueron evaluadas a través de la pruebas no paramétricas utilizando el paquete estadístico SYSTAT-7 (SPSS Inc, Francia, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo I

En ambas repeticiones se observó una mayor fecundidad ($P < 0.05$) del semen fresco respecto al semen refrigerado, explicada esta diferencia por una mayor fertilidad. Existieron diferencias entre las repeticiones, observándose para ambos parámetros reproductivos valores superiores en la hembras del CIEDAG.

La utilización de una doble dosis de semen fresco (110 *versus* 220 millones de espermatozoides: tratamientos 1 y 2 respectivamente), no determinó diferencias en ningún de los tres parámetros reproductivos evaluados (cuadro 1). Esto confirma resultados de experiencias anteriores, que demuestran que la utilización de dosis superiores a 100-120 millones de semen fresco puro o diluido, no mejoran la fertilidad (Fernández Abella *et al.*, 1992; Fernández Abella y Villegas, 1992).

El semen conservado durante 24-26 horas presentó reducciones importantes en fertilidad y fecundidad, respecto al semen fresco. Se observaron diferencias, según la repetición comportándose mejor la metodología francesa (diluyente INRA 83 más método de inseminación francés) en una repetición y el método nacional de inseminación cervical, utilizando el diluyente Fiser en la otra. Esto determina, que analizando los resultados en su conjunto no existan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.10$).

No se encontraron diferencias en el momento de realizar la inseminación (48 *versus* 55 horas de retiradas las esponjas). Esto contradice lo observado por Fernández Abella *et al.* (2003), quienes encontraron mayor fertilidad inseminando a las 46-48 horas, *versus* 50-52 horas, utilizando semen refrigerado a 5° C, en ovejas Merino sincronizadas con MAP. Esto se puede explicar por haber utilizado en el presente trabajo eCG (gonadotropina coriónica equina), y no en el ensayo mencionado. Es conocido, que la eCG (PMSG) además de incrementar las chances de fertilización (tasa ovulatoria), aumenta las con-

Cuadro 1. Fertilidad, prolificidad y fecundidad según tratamientos y repeticiones (Ensayo I).

CIEDAG (FLORIDA)				
TRATAMIENTO	N	FERTILIDAD %	PROLIFICIDAD	FECUNDIDAD %
1- Fresco 110:	29	89.7 a	1.19 b	106.7 a
2- Fresco 220:	28	75.0 a	1.38 a	103.5 a
3- INRA 48 h	37	18.9 c	1.00 c	18.9 c
4- FISER 48 h	40	30.0 c	1.33 a	39.9 b
5- INRA 52 h	26	50.0 b	1.08 b	54.0 b
6- FISER 52 h	49	26.5 c	1.15 b	30.5 b
	209			
Predio (MINAS)				
1- Fresco 110:	45	66.7 a	1.13	75.4 a
2- Fresco 220:	44	66.7 a	1.17	78.0 a
3- INRA 48 h	44	45.5 ab	1.20	54.6 b
4- FISER 48 h	44	27.3 b	1.17	31.9 c
5- INRA 52 h	52	28.8 b	1.20	34.6 c
6- FISER 52 h	38	28.9 b	1.10	31.8 c
	267			
	N	FERTILIDAD %	PROLIFICIDAD	FECUNDIDAD %
1- Fresco 110:	74	75.7 a	1.16	87.8 a
2- Fresco 220:	72	69.4 a	1.26	87.4 a
3- INRA 48 h	81	33.3 b	1.15	38.3 b
4- FISER 48 h	84	28.6 b	1.25	35.8 b
5- INRA 52 h	78	35.9 b	1.14	40.9 b
6- FISER 52 h	87	27.6 b	1.23	33.9 b
	476			

Diferentes letras en cada columna difieren al 5 %.

tracciones uterinas, mejorando el transporte espermático y disminuyendo la mortalidad embrionaria, contrarrestando el efecto negativo asociado al tratamiento con progestágenos (Lanford *et al.*, 1983; Prud'homme y Pele, 1984).

Ensayo II

Los resultados obtenidos son similares a los del ensayo I, aunque las fertilidades y fecundidades obtenidas con semen refrigerado son más elevadas (cuadro 2). No se observaron diferencias entre repeticiones.

Utilizando semen refrigerado e inseminación cervical, resultados de fecundidad del orden del 50%, son los valores más elevados reportados por la literatura (Maxwell y Salamon, 1993; Fernández Abella *et al.*, 2003; Fierro, 2005).

El uso de pentoxifilina, la cual es efectiva cuando se usa con semen congelado (Fernández Abella *et al.*, 2004b), no mostró con semen refrigerado cambios ni en fertilidad, ni en la fecundidad. No obstante, se observó “*in vitro*” una mejora en la motilidad espermática evaluada microscópicamente y se produjo una tendencia a incrementar la prolificidad en ambos diluyentes (cuadro 2).

En la literatura, se citan distintas sustancias como aditivos para mejorar la fertilidad del semen. Respecto al semen refrigerado, recientemente en el país, Fierro (2005), observó que el agregado de un 2% de glicerol a un diluyente en base de leche descremada UHT y yema huevo, mejoraba su fertilidad, realizando la inseminación tanto a las 24 horas de conservación, como a las 48 horas (Araujo *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

No se detectaron diferencias en la fertilidad, según al tipo de diluyente, ni por la metodología utilizada.

El agregado de pentoxifilina al semen refrigerado, no modificó la performance reproductiva.

Se observaron variaciones en la fertilidad, debidas al predio y al efecto año.

Utilizando semen refrigerado, en nuestras condiciones, es posible alcanzar el 40- 50% de fecundidad.

Agradecimientos

Se agradece al Ing. Agr. Raúl Oficialdegui y Sr. José P. Lopepe, por haber colaborado con animales e infraestructura necesarios para realizar este trabajo.

Cuadro 2. Fertilidad, prolificidad y fecundidad según tratamientos (Ensayo II).

Tratamiento	FERTILIDAD	PROLIFICIDAD	FECUNDIDAD	N
	%		%	
I Testigo	68.2 ^a	1.17 ab	79.8 a	85
II INRA	48.0 b	1.25 a	60.0 b	50
III Fiser	50.0 b	1.08 b	54.0 b	50
IV INRA-Ptx	42.0 b	1.33 a	56.0 b	50
V Fiser-Ptx	49.0 b	1.16 ab	56.9 b	50

a versus b : P < 0.05.

REFERENCIAS

- ARAUJO, A, GAMARRA, J., TEIXEIRA, V., FIERRO, S., GIL, J., OLIVERA, J. 2006. Efecto de dos diluyentes y dos tiempos de preservación de semen refrigerado sobre la concepción en IA cervical de ovinos en celo natural. *In. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría* :219-220.
- BRÜCKNER, G., KAMPLER, I. 1984. Zum Einflusseiner 22 h Flüssigkonservierung auf den Migrationsverlauf von 131 J-Sperma in Genitaltrakt weiblicher Schafe nach künstlicher Besamung Monatsh. *Veterinarmed* 39:126-129.
- COLAS, G. 1983. Factors affecting the quality of ram semen. *In Sheep Production* :453-465. *Butterworths Ed.*
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. 194 pp. *Butterworths eds.*
- FERNANDEZ ABELLA, D., ABELLA, O., RODRIGUEZ PALMA, R., ZANOTTA, G. 1992. Efecto de la dosis, la dilución y la conservación del semen en la fertilidad obtenida por inseminación cervical. *Bol. Téc. Cienc. Biol.* 2:21-36.
- FERNANDEZ ABELLA, D., VILLEGAS, N. 1992. Efecto de la dosis y el número de inseminaciones sobre la fecundidad ovina en el otoño y la primavera. *Bol. Téc. Cienc. Biol.* 2:15-19.
- FERNANDEZ ABELLA, D., VILLEGAS, N., BELLAGAMBA, M. 1998. Comparación de la fertilidad obtenida con semen conservado a 5° C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. *Producción Ovina SUL* 11:51-62.
- FERNANDEZ ABELLA, D., BONILLA RIERA, C., BONILLA RIERA, R., VILLEGAS, N., IBAÑEZ, W. 2001. Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5° C sobre el transporte espermático. *Producción Ovina SUL* 14:55-63.
- FERNANDEZ ABELLA, D., PREVE, M.O., VILLEGAS, N. 2003. Effects of time of insemination and dilution rate of liquid storage semen on sheep fertility. *Theriogenology* 60:21-26.
- FERNANDEZ ABELLA, D., BONILLA RIERA, C., IRABUENA, O., STERLA, S. 2004 a. Efecto del método de sincronización de celos y manejo del semen conservado sobre la fecundidad ovina. *Producción Ovina SUL* 16:19-31.
- FERNANDEZ ABELLA, D., BONILLA RIERA, C., IRABUENA, O., STERLA, S. 2004 b. Effect of pentoxifylline added to frozen-thawed semen on sheep fertility. *Proc. 15th Inter. Congr. Anim. Reprod. Vol.2. Biotech. Sperm. Abstr.* 482. *Porto Seguro, Brazil.*
- FIERRO, S. 2005. Comportamiento de diferentes diluyentes en base a leche con adición de yema de huevo y glicerol para la preservación de semen de carnero refrigerado (5° C): Ensayos in VITRO e in vivo en majadas Merino Fino. *Tesis Doc. en Ciencias Veterinarias*. 44 pp. *Montevideo. Uruguay.*
- GIL, J. 2002. Preservación de semen ovino. *In. Reproducción en los Animales Domésticos. Vol.II:365-385. R.Ungerfeld Ed. Melibea Eds. Uruguay.*
- GUERIN, Y. 1990. Méthode de conservation de la semence ovine. *Elevage et Insémination* 236 :3-14.
- MAXWELL, W.M.C., SALAMON, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:613-638.
- LANGFORD, G.A., MARCUS, G.J., BATRA, T.R. 1983. Seasonal effects of PMSG and number of insemination on fertility of progestogen-treated sheep. *J. Anim. Sc.* 57:307-312.
- PRUD'HOMME, M.J., PELE, B. 1984. Activité électromyographique de l'utérus chez la brebis pendant la saison sexuelle ; comparaison de l'oestrus naturel et l'oestrus induit par les progestogènes seuls ou avec une supplementation de PMSG. *Reprod. Nutr. Develop.* 24:33-44.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod Sci. Review. Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.