

MANUAL DE OBTENCION, PROCESAMIENTO Y CONSERVACION DEL SEMEN OVINO

Segunda edición

**Marcela Cueto, Alejandro Gibbons,
María Macarena Bruno-Galarraga y Jimena Fernández**



INTA | Ediciones

**AREA DE INVESTIGACION EN PRODUCCION ANIMAL
GRUPO DE REPRODUCCION Y GENETICA ANIMAL**

**MANUAL DE
OBTENCION, PROCESAMIENTO Y
CONSERVACION
DEL SEMEN OVINO**

**Segunda edición
2016**

Dra. Ing. Agr. Marcela Cueto
Dr. Méd. Vet. Alejandro Gibbons
Vet. María Macarena Bruno-Galarraga
Vet. Jimena Fernández

INDICE

INTRODUCCION.....	3
SELECCION DE MACHOS PARA SER UTILIZADOS EN LOS PROGRAMAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL.....	3
ENTRENAMIENTO DE MACHOS PARA LA RECOLECCION DEL SEMEN.....	3
RECOLECCION DEL SEMEN POR VAGINA ARTIFICIAL	7
MANIPULACION Y EXAMINACION DEL SEMEN	8
Color del semen	8
Motilidad de los espermatozoides	8
Volumen del semen.....	8
Determinación de la concentración espermática	9
CONGELAMIENTO DE SEMEN.....	11
Acondicionamiento del semen para su congelamiento.....	13
Congelamiento de semen en pastillas.....	13
Congelamiento de semen en pajuelas.....	15
MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN CONGELADO	15
DESCONGELAMIENTO DEL SEMEN	16
CONSERVACION DEL SEMEN FRESCO, ENFRIADO Y REFRIGERADO.....	18
PROTOCOLO PARA EL CONGELAMIENTO SEMINAL	20
LISTADO DE MATERIALES PARA EL CONGELAMIENTO DE SEMEN.....	21

INTRODUCCION

La obtención y fraccionamiento del semen de un carnero genéticamente superior para su utilización en fresco permite acelerar el mejoramiento de las características productivas de las majadas, al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se obtendrían en servicio natural. Las técnicas de congelamiento de semen posibilitan aún más la multiplicación y difusión de genes, al mismo tiempo que su conservación por períodos más prolongados de tiempo.

El uso de semen congelado ovino produjo un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al permitir acelerar considerablemente el flujo de material genético superior hacia sectores poblacionales de inferiores características productivas, así como al facilitar el transporte de semen a nivel internacional. Su utilización permite asimismo la absorción genética de una raza local por una introducida, a través de cruzamientos absorbentes en varias generaciones. Se evita también el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario.

Por último, es de destacar la posibilidad que brinda esta técnica de preservar especies en riesgo de extinción, así como conservar la variabilidad genética de aquéllas que se ven sujetas a un continuo proceso de mejoramiento de sus características productivas, al permitir el almacenamiento de semen fértil sin limitaciones de tiempo.

SELECCION DE MACHOS PARA SER UTILIZADOS EN LOS PROGRAMAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL

El objetivo de un programa de mejoramiento genético es el aumento de la producción (lana, carne, leche), en calidad y/o cantidad. Para el logro de este objetivo los reproductores a utilizar deben ser seleccionados por medidas objetivas de producción.

Además deberán tenerse en cuenta otros factores, como el estado sanitario de los animales, así como la ausencia de anormalidades físicas. Para evaluar el estado de los machos será necesario efectuar una revisión clínica completa.

Se deberá también evaluar el comportamiento reproductivo a través de un test de capacidad de servicio a corral, situando a los machos en presencia de hembras en celo. Será importante además, antes de comenzar el programa, evaluar que el macho seleccionado produzca semen en calidad y cantidad adecuadas.

ENTRENAMIENTO DE MACHOS PARA LA RECOLECCION DEL SEMEN

La calidad del semen que vayamos a utilizar al momento de la inseminación, depende tanto del método y época de recolección, como del estado general de los reproductores, siendo importante tener en cuenta todos los aspectos que hacen al manejo de los mismos.

Las situaciones que provoquen stress en los machos tales como la esquila, el transporte y el acostumbramiento a una nueva alimentación, deberán concluirse 6 a 8 semanas antes de su inclusión en un programa de inseminación artificial (IA). Es aconsejable suplementar a los machos durante el período de recolección de semen.

El método más recomendado para la recolección de semen es la vagina artificial, ya que permite obtener eyaculados con alta motilidad y concentración espermática. No produce stress en los animales, siendo el método de elección para programas de congelamiento seminal de alta frecuencia de colectas. En contraposición, cuando el semen es colectado por electroeyaculación, los machos se ven sometidos a condiciones de stress; por lo tanto sólo se recomienda su empleo cuando no puedan ser entrenados para la recolección con vagina artificial, y para su utilización en IA con semen fresco. Usualmente se obtienen eyaculados de mayor volumen -debido a una sobrestimulación de las glándulas seminales, productoras del plasma seminal-, pero con una menor concentración espermática. Asimismo es frecuente la contaminación con orina.

Los machos seleccionados por sus aspectos genéticos, reproductivos y sanitarios deben ser entrenados para realizar la monta en un maniquí o hembra en celo inmovilizada, que permita colectar el eyaculado en la vagina artificial en presencia de un operador.

Las siguientes consideraciones favorecen una rápida adaptación a la rutina de colección seminal por el método de la vagina artificial:

- En la época reproductiva se facilita el entrenamiento, dado que el incremento del interés sexual o líbido disminuye la inhibición de los reproductores a realizar la monta en presencia del hombre.
- El entrenamiento se iniciará con tiempo suficiente para que los animales se adapten a una rutina de trabajo, entre 20 a 30 días previo a la colecta seminal.
- Será necesario iniciar el entrenamiento con más machos de los necesarios, debido a que algunos de ellos no se adaptarán a la rutina de obtención seminal mediante la vagina artificial.
- Los animales jóvenes se amansan con mayor facilidad y presentan mayor vida útil.
- La presencia de “machos demostradores”, es decir ya entrenados para eyacular en vagina artificial, facilitan el entrenamiento.
- Las rutinas de manejo, así como un trato amable y pausado, reducen el stress de los animales y acortan los tiempos de entrenamiento.

Los *machos de cabaña* están acostumbrados a la presencia del hombre, así como a las instalaciones, facilitando su entrenamiento para la recolección de semen mediante la vagina artificial. Cuando los *machos provienen de majadas* en producciones extensivas, será necesario acostumbrarlos previamente a la presencia del hombre y las instalaciones. El hecho de que presenten alta líbido facilitará el acostumbramiento.

Una vez que los machos se han habituado a la presencia del hombre e instalaciones, se permitirá que los mismos realicen montas o servicios con una hembra fija en un brete de sujeción, en presencia de un operador (Figura 1). Alcanzada esta rutina de trabajo, el operador podrá acercarse a la hembra en celo y realizar la maniobra de recolección de semen en la vagina artificial. El proceso podrá demandar entre 3 y 10 días de trabajo.

Para el entrenamiento, se contará con una hembra en celo. El mismo podrá inducirse por la administración intramuscular de 0.5 ml de ecp estradiol® (Konig, Argentina). Las hembras tratadas presentarán celo 48 horas después de la aplicación, siendo necesario repetir el tratamiento día por medio para mantener la inducción del celo. Es aconsejable seleccionar una oveja de temperamento tranquilo. Asegurando la hembra en un brete de sujeción se facilitará la recolección seminal.

Cuando se considere efectuar el “re entrenamiento” de los machos al inicio de una nueva temporada reproductiva, será necesario disponer de un período de 20 a 30 días para realizar las actividades que provoquen stress a los carneros (esquila, instalaciones, cambio de alimentación) y reforzar su alimentación.

Asimismo será importante considerar que si los reproductores estuvieron fuera de servicio por un tiempo prolongado, la calidad espermática de los primeros eyaculados puede ser baja. Por tanto será necesario realizar una “remoción de las reservas espermáticas envejecidas”, recuperando los primeros eyaculados mediante vagina artificial para luego desecharlos o permitiendo que los animales realicen varias montas o servicios previo al congelamiento seminal.

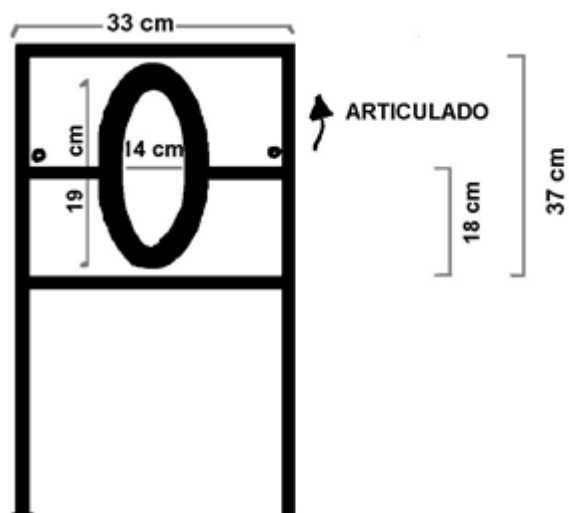
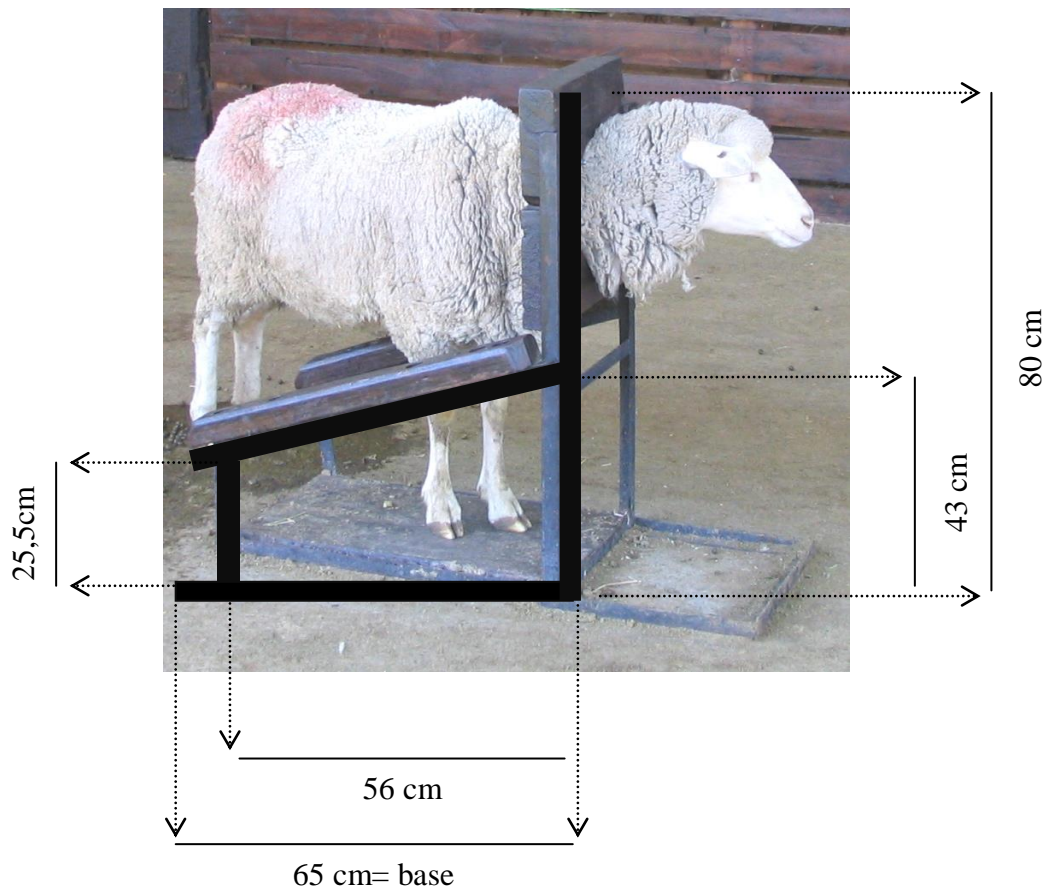


Figura 1. Diagrama y medidas del brete de sujeción para la obtención de semen por vagina artificial.

RECOLECCION DEL SEMEN POR VAGINA ARTIFICIAL

La vagina artificial provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación. Consiste en un tubo externo rígido, por ej. caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5 cm) y una camisa interna de látex. La misma se repliega y asegura sobre los extremos del tubo mediante bandas elásticas formando, entre el tubo y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremos de la vagina, se adosa un tubo colector.

La vagina se carga con 40-60 ml de agua caliente a 50 °C o más, según las pérdidas de calor que se produzcan hasta el momento de su utilización, siendo importante que la temperatura interior de la misma al momento de la eyaculación sea de aproximadamente 40 °C. En ambientes muy fríos pueden disminuirse las pérdidas de calor protegiendo el conjunto con una funda exterior, y al tubo recolector previamente templado, con un estuche de telgopor.

El acondicionamiento final de la vagina se logra por el agregado de aire a la cámara de agua con el fin de estrechar la luz vaginal a aproximadamente 1 cm de diámetro. La vagina cuenta con una válvula lateral que facilita esta operación.

Asegurada la oveja en el brete de sujeción, el operador se ubicará del lado derecho del macho de modo que su mano diestra sujete la vagina con el extremo abierto frente al prepucio, en un ángulo de 45° con respecto al piso, debiendo estar preparado para una monta y eyaculación veloz. Cuando el macho monta, el operador debe desviar el pene lateralmente para enfrentarlo a la vagina artificial. Un "golpe" del animal hacia arriba y hacia adelante indica que la eyaculación ha ocurrido.

Inmediatamente después del salto, el tubo de recolección se protege con la mano de los cambios bruscos de temperatura y se coloca en un baño termostático a 36 °C.

La frecuencia con la cual se puede obtener semen de un carnero depende de su líbido, condición corporal y temperamento. Un régimen de 2-3 saltos por día por un período de 4-5 días seguidos, continuado por un descanso de 2-3 días, mantiene la calidad y cantidad del semen.

Es importante evitar la contaminación del semen recolectado, con polvo u otra suciedad. Por lo tanto, la recolección del semen se hará en un lugar limpio y libre de polvo. Al mismo tiempo se considerarán las siguientes maniobras de limpieza y en los momentos sugeridos a continuación:

Una o dos semanas antes de iniciar la rutina de recolección de semen:

1. Se deberá esquila la panza de los carneros.
2. En el caso que fuera necesario se recortarán los pelos prepuciales.

Por la mañana de cada día de recolección de semen, con los animales de pie:

3. Se limpiará el prepucio de los machos mediante la introducción de 20 ml de solución fisiológica o citrato de sodio. Se deja escurrir y se seca con un paño.

Previo a la recolección de semen, con los animales de pie:

4. Se limpiará el área prepucial y el prepucio externamente con un paño húmedo (no mojado).

De esta manera se reducirá la contaminación del semen al momento de su recolección.

MANIPULACION Y EXAMINACION DEL SEMEN

Luego de su recolección, es importante que el semen se mantenga protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa e impurezas. Por lo tanto, todo el material que entre en contacto con el eyaculado deberá ser de vidrio o de plástico, estará limpio y seco, y a la misma temperatura que el semen.

Será de suma importancia que el tiempo que transcurra entre la obtención del semen y el agregado del diluyente sea el menor posible.

La observación del color del semen, así como la apreciación de su motilidad masal, son importantes para decidir si se procederá a la utilización del eyaculado.

El volumen y concentración espermática deben ser estimados antes de su utilización, para realizar una correcta dilución según el volumen y el número de espermatozoides totales a inseminar por dosis. El volumen promedio del eyaculado del carnero es de 1 ml (0.7-3 ml), y su concentración varía entre 2000-6000 millones de espermatozoides/ml.

La dilución del semen para la IA se lleva a cabo por razones técnicas y biológicas:

- Razones técnicas: incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un mayor número de hembras.
- Razones biológicas: proveer a los espermatozoides, nutrientes y protección de las temperaturas de enfriamiento y congelamiento.

Color del semen

El color del semen debe ser blanco-lechoso o cremoso pálido. El color rojizo indica la presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho.

Motilidad de los espermatozoides

Luego de homogeneizar el eyaculado por agitación del tubo de recolección, se retira una gota de semen con micropipeta y se coloca sobre un portaobjeto templado (sobre platina térmica) para su observación microscópica con 100 aumentos.

Se podrá tener una idea de la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas (motilidad masal). La *motilidad masal* se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo). Para proceder al congelamiento de un eyaculado, se recomienda que su motilidad masal sea igual o mayor de 4.

Volumen del semen

El volumen del semen se mide utilizando un tubo de recolección graduado. Cuando la recolección se realiza con vagina artificial, normalmente se obtiene un volumen de eyaculado de aproximadamente 1 ml; éste varía según la edad, el tamaño y la condición corporal del animal, la frecuencia de colección y la destreza del operador.

Determinación de la concentración espermática

Hay distintos métodos que permiten la determinación de la concentración espermática, entre ellos se menciona el recuento en cámara de Neubauer o por fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos; si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido en comparación con la cámara de Neubauer, su costo es más elevado.

1. Recuento en Cámara de Neubauer

La cámara de recuento consta de dos piezas: a) una pieza de vidrio en la que se encuentra labrado el reticulado en que se depositará el material a examinar; b) un cubreobjetos específico que montado sobre la pieza anterior formará la cámara propiamente dicha. La cámara de conteo es un portaobjetos de vidrio grueso con dos cuadrículas situadas a un lado y otro (superior e inferior) del centro de la cámara. Cada cuadrícula presenta 4 cuadrantes, con 16 cuadrados cada uno (cuadrados grandes) (Figura 2). Las dimensiones de los cuadrantes de 1 mm de lado por 0.1 mm de profundidad, determinan un volumen de 0.1 mm^3 .

Cuadrante

Cuadrado grande

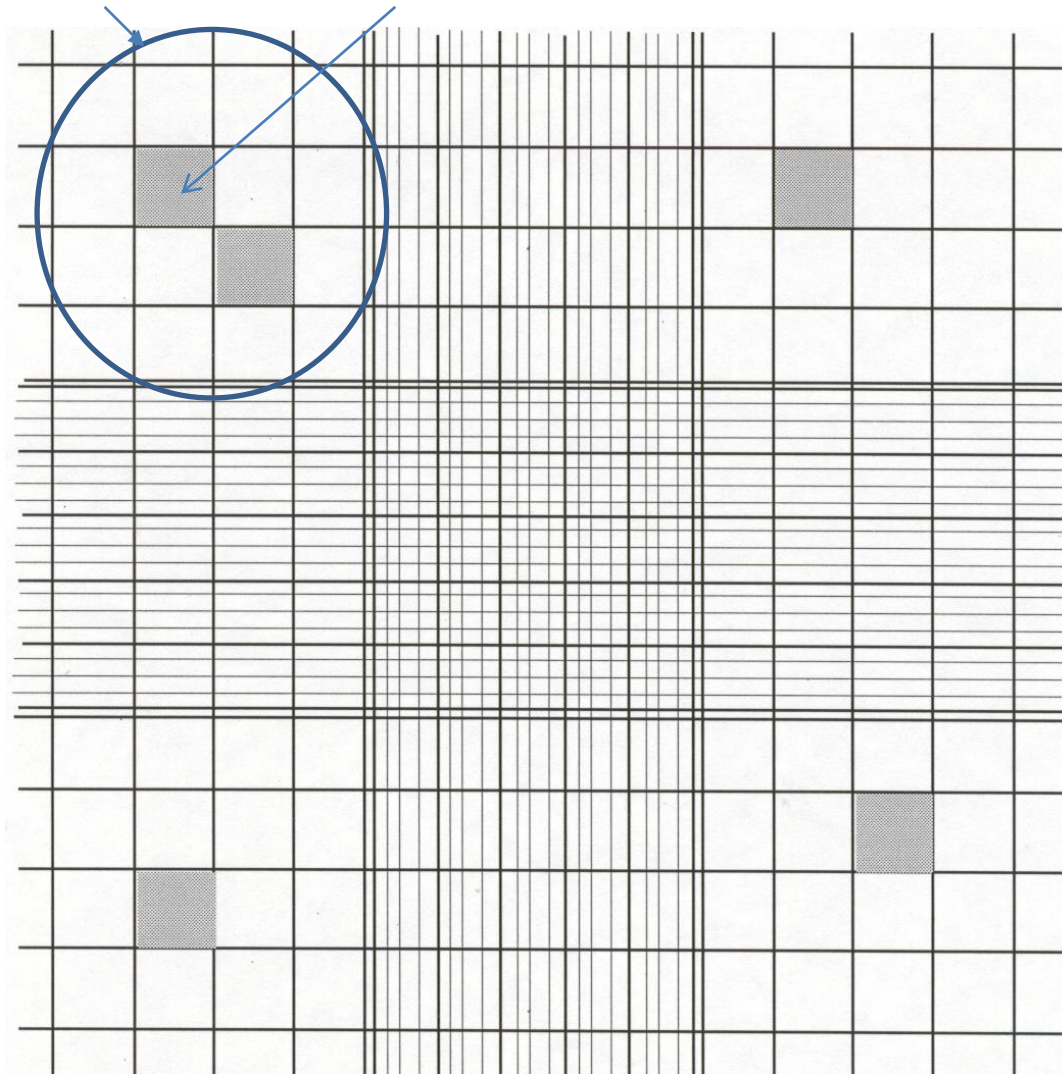


Figura 2. Diagrama de la cuadrícula de la Cámara de Neubauer.

El recuento en cámara se lleva a cabo a través de los siguientes pasos:

- Adherir el cubreobjetos sobre la cámara humedeciendo sus bordes con saliva y ejerciendo luego una firme presión contra la cámara. Si la adhesión es correcta se observa en los bordes del cubreobjetos un fenómeno de difracción de la luz denominado "anillos de Newton".
- Aspirar 5 microlitros de semen mediante micropipeta (previa homogenización del eyaculado).
- Secar los laterales del tip de la micropipeta con papel blanco, cuidando de no variar el enrase.
- Diluir los 5 microlitros de semen en un tubo con 2 ml de líquido de dilución (puede ser agua común) (dilución 1:400).
- Luego de agitar el tubo, cargar la micropipeta con aproximadamente 10 microlitros.
- Colocar la punta del tip de la micropipeta en el borde del cubreobjetos y dejar que la cámara se cargue por capilaridad. El líquido no debe pasar a los surcos laterales de la cámara ni deben quedar burbujas de aire o zonas sin cargar.
- Colocar la cámara bajo observación microscópica (100 aumentos). Si los espermatozoides no están distribuidos uniformemente en toda la cámara, debe repetirse la operación de cargado.
- Dejar reposar unos minutos antes de iniciar el recuento.
- Se cuenta el número de espermatozoides en un cuadrado grande por cada cuadrante y se repite el conteo en uno de los cuadrantes elegido al azar, contándose en total 5 cuadrados.

La concentración de espermatozoides/ml se calcula multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrados por 12.800.000.

Dilución 1:400; volumen correspondiente a 16 cuadrados grandes= 0.1 mm^3

Esp en $0.1 \text{ mm}^3 = \frac{\text{Suma de esp en los 5 cuadrados} \times 400 \times 16}{5}$

Esp/ml= $\frac{\text{Suma de esp en los 5 cuadrados} \times 400 \times 16 \times 10.000}{5}$

Esp/ml= $\text{Suma de esp en los 5 cuadrados} \times 12.800.000$ (constante= $\frac{400 \times 16 \times 10.000}{5}$)

Recordar: $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$

2. Fotocolorímetro

El método se basa en exponer una muestra de semen a un haz de luz y registrar la cantidad de luz absorbida por la misma (absorbancia). La concentración de la muestra será directamente proporcional a la absorbancia.

El colorímetro debe ser calibrado con 10-15 conteos realizados en cámara de Neubauer de tal manera de obtener un gráfico de calibración. Si se trabaja con más de una especie (ovino – caprino), es necesario realizar un gráfico por especie. Para su calibración, se utilizarán muestras de semen correspondientes a distintas concentraciones, fijando una dilución de semen en agua (por ejemplo 1:350). La exactitud del colorímetro deberá ser chequeada periódicamente.

Los pasos a seguir en la determinación de la concentración espermática por colorimetría son:

- Seleccionar la longitud de onda adecuada (530 nanómetros= filtro verde).
- Colocar la cubeta de "blanco de calibración" que contiene agua destilada y llevar la escala a cero.

- Preparar una muestra de semen con igual dilución que la utilizada al realizar la curva de calibración (1:350; llevar 10 microlitros de semen a 3.5 ml con agua destilada). Homogeneizar bien.
- Reemplazar el tubo "blanco" del colorímetro por el tubo conteniendo la muestra. Anotar la lectura al minuto de colocarlo en el aparato.
- Interpolarse el valor de la lectura en el gráfico de calibración para obtener la concentración espermática de la muestra.

CONGELAMIENTO DE SEMEN

La dilución del semen para su posterior congelamiento se podrá realizar mediante a) diluyentes preparados en el laboratorio o b) diluyentes comerciales.

a) Preparación de diluyente

TRIS	3.63 g
Glucosa	0.50 g
Acido cítrico	1.95 g
Yema de huevo	15 ml
Glicerol	5 ml
Estreptomina	0.1 g
Penicilina	100.000 U.I.
Agua destilada apirógena hasta completar 100 ml	

Los diluyentes contienen TRIS (Hidroximetil Aminometano) o citrato como buffers y glucosa como fuente de energía. Además, deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5 °C (generalmente yema de huevo) y el congelamiento (generalmente glicerol).

Solución Madre: la solución madre está formada por TRIS, glucosa y ácido cítrico. Esta solución puede conservarse enfriada en la heladera por 2 o 3 días, o congelada por un tiempo mayor. Es recomendable volver a medir el pH al momento de su utilización.

En una probeta de 100 ml se colocan el TRIS, la glucosa y el ácido cítrico y se enrasa a 80 ml con agua destilada apirógena. La disolución se realiza por agitación, entibiando ligeramente. Se procede a determinar el pH, cuyos valores deben estar entre 6,7 y 6,9. Si el pH fuera ácido se corrige con una solución de hidróxido de sodio débil (1M= diluir 0.4 g de NaOH en agua destilada hasta completar 10 ml de solución); si fuera alcalino se corrige con una solución de ácido cítrico (1M= diluir 1.9 g de ácido cítrico en agua destilada hasta completar 10 ml de solución).

Es conveniente completar la preparación del diluyente el día de su utilización, agregando la yema de huevo a la solución madre; esta última debe entibiarse previamente en baño termostático para facilitar la homogeneización. La yema debe ser fresca, proveniente de un huevo de no más de 3 días. La cáscara de huevo se lava cuidadosamente, se limpia con un paño mojado en alcohol, y se deja secar. Luego de que se separa la clara, la yema se sitúa sobre un papel absorbente, cuidando de que no se rompa su membrana. El resto de clara puede terminar de separarse haciendo rodar la yema suavemente sobre el papel. Atravesando la membrana de esta última con una jeringa, se extrae la yema desde el interior y se enrasa la cantidad necesaria en la probeta. Una vez agregada la yema de huevo, la solución se homogeneiza varias veces invirtiendo la probeta tapada con papel de aluminio.

A continuación, se fracciona en dos partes:

- Solución A: 50 ml de la solución obtenida.
- Solución B: 45 ml de la solución obtenida, más el agregado de 5 ml de glicerol.

El glicerol se agrega a la solución B, previamente entibiada, para lograr una buena homogeneización.

La solución B se coloca tapada en heladera a 5 °C. Es importante que la heladera no enfríe por debajo de 4-5 °C. La solución A se coloca en baño termostático a 36 °C.

b) Diluyente comercial

El Triladyl® (Minitub, Alemania) es un concentrado para la preparación de un diluyente de crioconservación de semen basado en TRIS. La solución madre se prepara mezclando una parte de concentrado de Triladyl con tres partes de agua destilada. Esta solución madre puede mantenerse a 5 °C por 5-7 días.

Para completar la preparación del diluyente, el día de su utilización, debe agregarse una parte de yema de huevo fresca a la solución madre (Solución final= 1:3:1 Triladyl, agua destilada y yema de huevo).

A continuación, se fracciona en dos partes iguales, una de ellas se colocará en baño de agua a 36 °C (Solución A) y la otra en heladera a 5 °C (Solución B).

Agregado de la solución A

La dilución del semen se inicia con la solución A antes de comenzar la curva de descenso de temperatura y se completa con la solución B luego de su permanencia a 5 °C por 45-60 minutos.

Una vez verificado que la cámara de Neubauer ha quedado correctamente cargada para realizar el conteo espermático, se puede hacer una dilución provisoria del semen agregándole igual volumen de solución A (considerando que se llevará a una dilución mayor), con el fin de preservarlo mientras se determina la dilución final. Tanto el semen como el diluyente deben mantenerse en baño termostático a 36 °C. El agregado del diluyente se hace con una pipeta lavada, seca y templada, volcando el diluyente por las paredes del tubo que contienen el semen y homogeneizando suavemente.

Conocida la concentración de espermatozoides por ml, se procederá a determinar el volumen de solución A a añadir, según el Protocolo de Procesamiento de Semen (ver hoja adjunta). Se procede al agregado del diluyente A, teniendo en cuenta las recomendaciones anteriores; debido al mayor volumen, es conveniente trasvasar el eyaculado más el diluyente a un vaso de precipitado (aprox. 40 ml).

El número de espermatozoides/dosis recomendado para la inseminación intrauterina es de alrededor de 50 millones de espermatozoides. Los volúmenes por dosis de inseminación varían entre 0.1 y 0.3 ml; las pajuelas francesas tienen un volumen de 0.25 ml.

Descenso de temperatura-Tiempo de estabilización

Agregado el total de diluyente A, el vaso de precipitado que contiene el semen diluido, tapado con papel aluminio, se coloca en un recipiente de telgopor con agua a 36 °C, acompañado de un termómetro de fácil lectura. A continuación, se inicia el descenso de temperatura desde 36 a 5 °C en 30-35 minutos, a razón de 2 °C cada 3 minutos aproximadamente. Este descenso se logra con el agregado gradual de trocitos de hielo al baño de agua que rodea al semen.

Luego de la fase de descenso de temperatura, se inicia la etapa de equilibramiento. En esta etapa, el semen debe permanecer en heladera a 5 °C durante 45-60 minutos.

Agregado de la solución B

Completado el tiempo de estabilización de la temperatura, se agrega la solución B con una pipeta enfriada previamente en la heladera. El diluyente B se agrega en 3 fracciones de igual volumen (1º, 2º y 3º glicerolización), a intervalos de 10 minutos, homogeneizando el diluyente y el semen luego de cada agregado. Al momento de agregar la solución B, es importante que esté a la misma temperatura que el semen (entre 5 y 7 °C), por lo tanto es importante verificar la temperatura de la solución B antes de proceder a su adición.

Acondicionamiento del semen para su congelamiento

Realizada la última glicerolización, se procederá al congelamiento de semen.

El semen de carnero puede congelarse en pajuelas en vapores de nitrógeno líquido, o en pastillas en hielo seco (dióxido de carbono sólido). El semen congelado por cualquiera de estos 2 métodos se conserva en termo de nitrógeno líquido.

El congelamiento en pastillas es relativamente simple y éstas son fáciles de manipular. Sin embargo, el comercio internacional de semen se realiza en pajuelas, que permiten una correcta identificación.

Congelamiento de semen en pastillas

Para el congelamiento de semen en pastillas, es necesario contar con un bloque de hielo seco de superficie lisa, al cual se le moldearán celdas en su superficie, mediante clavos previamente calentados a la llama. Convendrá hacer la operación de congelamiento en una habitación fría. En la Figura 3 se presenta un diagrama de la caja para fabricar hielo seco para el congelamiento de semen en pastillas.

El semen se retirará de la heladera en un baño de agua a 5 °C. Se contará con una pipeta de vidrio enfriada en la heladera.

Una vez pipeteado el semen, se vuelcan desde la pipeta, en forma rápida y sucesiva, volúmenes de 0.1-0.3 ml (3-8 gotas) por celda, tratando de que el tiempo transcurrido entre el goteo de la primera pastilla y la última no supere el minuto. Dichos volúmenes permanecen allí por un minuto, hasta que la superficie de las pastillas se opaque. Luego se trasladarán al termo de nitrógeno líquido. Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento de la temperatura del semen a 5 °C durante toda la operación de goteo. Si se prevee el congelamiento de sémenes

de distintos carneros, sera necesario contar con varias pipetas previamente enfriadas (una por carnero).

Una vez almacenadas las pastillas en el termo, es conveniente evaluar la calidad de la partida congelada.

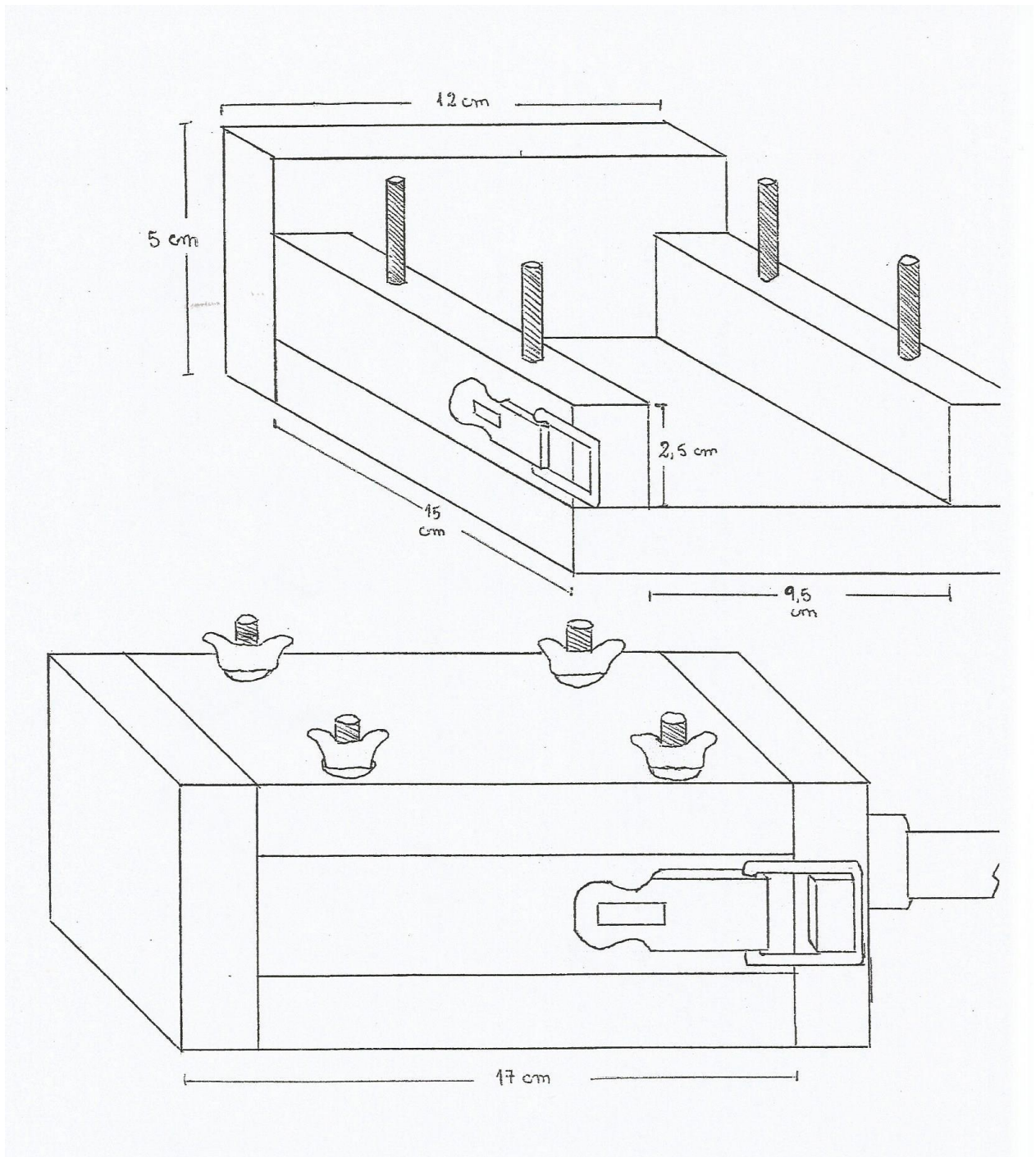


Figura 3. Diagrama de las medidas de la caja para fabricar hielo seco para el congelamiento de semen en pastillas.

Congelamiento de semen en pajuelas

1. Fraccionamiento del semen en pajuelas

Las pajuelas, el alcohol polivinílico y una jeringa con aguja de 1.5 cm serán colocados en la heladera con anterioridad. Se debe homogeneizar bien el semen diluido antes de proceder al llenado de las pajuelas. Las pajuelas se cargan pipeteando las dosis seminales a través del tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón), sumergiendo el extremo sin tapón en el semen. Para proceder al llenado de las pajuelas, se las toma del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano al semen). El alcohol polivinílico del tapón triple gelifica y sella en contacto con el líquido. En el extremo sin tapón, se crea una cámara de aire de 1.5 cm (con jeringa con aguja), se lo seca con papel absorbente y se sella con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa que contenga alcohol polivinílico. Deberá quitarse el excedente de alcohol polivinílico para que las pajuelas no se adhieran entre sí. Las pajuelas se sumergen inmediatamente en un recipiente con agua a 5 °C, de tal forma de conservar el semen a baja temperatura; el tapon recién formado gelifica y sella en contacto con el agua.

Es importante que esta operación se lleve a cabo con rapidez y en un ambiente a baja temperatura, por lo que se recomienda realizar la manipulación en el interior de la heladera o en una habitación fría.

Pueden utilizarse distintos colores de alcohol polivinílico para identificar eyaculados de diferentes carneros y/o diferentes partidas de un mismo carnero.

2. Congelamiento en vapores de nitrógeno líquido

Será necesario contar con una caja de telgopor, con tapa, de aproximadamente 39 cm de largo por 34 cm de ancho por 25 cm de altura. Asimismo se contará con tacos de madera, una gradilla y un soporte metálico para pajuelas, de 11 cm de largo, 7 cm de ancho y 2 cm de altura (Fotos, pág. 21). El soporte metálico sobre los tacos de madera y la gradilla alcanzará 19 cm de altura con respecto al fondo de la caja (1º nivel), mientras que sobre la gradilla será de 9 cm (2º nivel).

Se vuelca nitrógeno líquido en la caja de telgopor hasta 6 cm respecto del fondo. En el interior de la caja se colocan el marco de aluminio sobre los tacos de madera y la gradilla. Se tapa por unos minutos hasta que se enfrie su interior. Luego de secar las pajuelas, se colocan sobre el marco de aluminio, apoyando sólo sus extremos y cuidando de que no se toquen entre sí. Se tapa la caja por 2 minutos. Seguidamente el marco con las pajuelas se ubica en el 2º nivel durante 3 minutos (luego de haber retirado los tacos de madera). Finalmente las pajuelas se vuelcan directamente en el nitrógeno y se almacenan en portapajuelas en un termo de nitrógeno líquido.

Una vez almacenadas las pajuelas en el termo, es conveniente evaluar la calidad de la partida seminal.

MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN CONGELADO

Las pajuelas se guardarán en portapajuelas identificados en la parte superior, dentro de los canastillos del termo de nitrógeno líquido. Las pastillas se almacenarán en canastillos con elevadores. Se recomienda utilizar un tapón de algodón perfectamente seco para acondicionar las pajuelas o pastillas en el interior de los canastillos.

Durante su almacenamiento, es importante controlar el nivel de nitrógeno líquido de los termos periódicamente (semanal o quincenalmente), teniendo en cuenta que el mismo no debe descender por debajo de los 10 cm.

Cuando se manipula el semen dentro del termo, es importante no elevar los canastillos por encima de la boca del termo.

DESCONGELAMIENTO DEL SEMEN

El descongelamiento de semen debe realizarse a una temperatura de 36 °C. Si el semen fue congelado en *pastillas*, su descongelamiento puede llevarse a cabo en tubos de hemólisis secos mantenidos a 36 °C en baño termostático. Los mismos se agitarán durante un minuto dentro del baño para asegurar un descongelamiento homogéneo.

Si el congelamiento del semen se realizó en *pajuelas*, las mismas se sumergirán en un baño termostático a 36 °C, moviéndolas con una pinza durante 15 segundos bajo el agua. Luego de su descongelamiento, la pajuela se sacará del agua, procediéndose al secado y cortado del tapón del extremo con cámara de aire. El extremo libre se tapa con un dedo antes de cortar el otro extremo y se destapa al momento de vaciar el contenido de la pajuela en un tubo de hemólisis previamente colocado en baño termostático.

Examinación del semen post-descongelamiento

La estimación de la calidad del semen descongelado es de suma importancia. Se procederá a la evaluación de al menos dos pajuelas o pastillas por partida. Es importante realizar varias observaciones de la misma pajuela o pastilla.

Luego de su descongelamiento, se procederá a la examinación microscópica de una gota de semen en un portaobjeto templado (100 aumentos) sobre platina térmica. Se observará la motilidad masal al descongelamiento, repitiendo la observación 1 o 2 veces.

A continuación se observará una gota de 5 a 10 microlitros de semen descongelado entre porta y cubreobjetos templados. En esta evaluación es importante estimar el *porcentaje de espermatozoides vivos*, así como la *motilidad individual progresiva*. La motilidad individual progresiva se estima como la velocidad de desplazamiento hacia adelante de los espermatozoides vivos en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo). Subjetivamente podemos estimar esta escala según las siguientes apreciaciones:

- 0, los espermatozoides no se mueven.
- 1, los espermatozoides se mueven en el lugar, giran sobre sí mismos.
- 2, los espermatozoides se trasladan brevemente, pero “se quedan”.
- 2.5, los espermatozoides se trasladan, puedo seguir su trayectoria con la vista.
- 3, los espermatozoides se trasladan, es difícil seguir su trayectoria con la vista.
- 4, los espermatozoides se trasladan a mucha velocidad, prácticamente no puedo seguir su trayectoria con la vista, “los veo pasar”.
- 5, los espermatozoides se trasladan a tanta velocidad que no puedo seguir su trayectoria con la vista, “no los veo pasar”.

Para aceptar una partida, las pajuelas o pastillas deben poseer (luego de 4 a 5 minutos de incubación a 36 °C en baño termostático):

- a) Motilidad masal al descongelamiento.
- b) Un porcentaje de espermatozoides vivos igual o superior al 30%.
- c) Motilidad individual progresiva igual o superior a 2.5.

Descongelamiento del semen para su utilización en la inseminación artificial intrauterina

El descongelamiento seminal deberá realizarse en un ambiente templado (25 °C) y libre de polvo. El lugar debe disponer de una mesada limpia en donde se colocarán un baño termostático a 36 °C y un microscopio óptico con una platina térmica.

Por otro lado, es indispensable que las ovejas a inseminar se encuentren agrupadas y cerca del área de trabajo y que el primer animal al que se le practicará la IA laparoscópica se encuentre sobre la camilla de inseminación al momento de realizar el primer descongelamiento.

Las dosis seminales deberán estar evaluadas y aceptadas previo al trabajo de inseminación. Una vez descongelado el semen, se procederá a su utilización sin ningún tipo de dilución. La dosis seminal podrá cargarse directamente en la jeringa de inseminación desde el tubo de hemólisis donde fue descongelada. El aspic debe mantenerse templado desde su cargado hasta que se le entrega al inseminador.

El tiempo recomendado entre el descongelamiento del semen y su inseminación varía según la calidad seminal post descongelamiento (valores de referencia: 5 a 20 minutos); este tiempo deberá ser de 5 minutos para los sémenes que fueron evaluados con los valores mínimos de aceptación.

Si se utiliza sémenes de distintos carneros, deberán cambiarse los tubos de hemólisis y aspics entre carnero y carnero (para asegurarnos su paternidad).

En una planilla, se llevará registro del número de caravana de la madre y el semen empleado.

Durante los trabajos de inseminación se chequeará la motilidad masal cada 4 a 5 dosis seminales descongeladas, colocando una gota del semen en un portaobjetos previamente templado sobre platina térmica y observando la misma en el microscopio óptico.

CONSERVACION DEL SEMEN FRESCO, ENFRIADO Y REFRIGERADO

Semen fresco: el semen que se emplea inmediatamente después de su recolección, podrá mantenerse a 28-30 °C en baño termostático durante su utilización, ya sea puro o diluido.

Semen enfriado: podrá conservarse por el transcurso de 8 horas a 15 °C.

Semen refrigerado: podrá conservarse por el transcurso de 12 horas a 5 °C.

En estos 2 últimos casos, es necesario proceder a su dilución para lograr una adecuada conservación.

Preparación del diluyente

Los diluyentes para semen fresco, enfriado o refrigerado pueden ser sintéticos en base a TRIS o citrato, glucosa o fructosa y yema de huevo, o naturales en base a leche descremada en polvo.

Diluyente en base a leche descremada

Para diluir el semen fresco, se podrá utilizar leche descremada en polvo reconstituida en agua destilada al 10%. Por ej. 5 g de leche descremada en 50 ml de agua destilada. El diluyente tapado con papel de aluminio se mantendrá a 92-94 °C en baño de agua, durante 10 minutos. Una vez cumplimentado este tiempo, se lo retira del fuego y se lo sitúa en baño termostático a 30 °C.

Para conservar el semen enfriado o refrigerado, una vez situado el diluyente en base a leche descremada en baño termostático, se verifica que su temperatura descienda a 30 °C, y se le añadirá 0.5 g de glucosa, 0.1 g de Estreptomina y 100.000 U.I. de Penicilina, por cada 100 ml de agua destilada.

El diluyente debe ser preparado inmediatamente antes de su utilización, verificando que su pH se encuentre entre 6.7 y 6.9.

Dilución del semen

La dilución del semen se realizará en forma aproximada, asegurándose una cantidad de 100 a 300 millones de espermatozoides por dosis (100, 150 y 300 millones de espermatozoides para la inseminación cervical con semen fresco, enfriado y refrigerado, respectivamente). Por ej. si se tiene un eyaculado con un volumen de 1 ml y una concentración aproximada de 3000 millones de espermatozoides/ml para inseminar 30 hembras con semen fresco, utilizando 0.1 ml de dosis de inseminación por oveja, se requieren 3 ml totales de semen diluido. De tal manera que si se le agregan al semen 2 ml de diluyente, se completan las 30 dosis de inseminación.

La dilución se llevará a cabo a 30 °C teniendo en cuenta que el diluyente se agrega con pipeta limpia, seca y entibiada, dejándolo escurrir por las paredes del tubo de recolección.

Semen fresco diluído

La temperatura del baño termostático se mantendrá a 30 °C. Se recomienda evitar que transcurra más de una hora desde la extracción del semen hasta la última inseminación.

La observación del semen al microscopio durante la inseminación permitirá verificar que el mismo conserve su motilidad masal.

Semen enfriado y refrigerado

Luego de realizar la dilución del semen, el mismo se lleva a temperatura de 15 o 5 °C para el semen enfriado y refrigerado, respectivamente, siguiendo una curva de enfriamiento a razón de 2 °C cada 3 minutos aproximadamente. De esta forma el semen puede conservarse por un período de 8 horas (semen enfriado) o 12 horas (semen refrigerado).

PROTOCOLO PARA EL CONGELAMIENTO SEMINAL

DURANTE EL CONGELAMIENTO											POST DESCONGELAMIENTO				
A. Identif carnero	B. Mot Masal	C. Vol eyac	D. Conc esperm	E. Espz totales	F. N dosis	G. Vol total	H. Vol diluy	I. Vol A/ Vol B	J. Vol A - Prov	K. Vol B/3	Dosis reales	Mot Masal	% vivos	MIP	Conc esperm
				C x D	E/50	F x 0.25	G - C	H/2							

- A. Identif carnero: Identificación del animal
- B. Mot. Masal: Motilidad masal del semen (Escala subjetiva: máximo, 5; mínimo, 0)
- C. Vol eyac: Volumen del eyaculado en ml
- D. Conc esperm: Concentración espermática en millones/ml
- E. Espz totales: Número total de espermatozoides en el eyaculado (C x D)
- F. N dosis: Número de dosis a obtener del eyaculado (Espz totales/Número de espermatozoides por dosis= E / 50)
- G. Vol total: Número de dosis a obtener del eyaculado x Volumen de la dosis (F x 0.25)
- H. Vol diluy: Volumen total – Volumen de eyaculado (G – C)
- I. Vol A/Vol B: Volumen de diluyente A y Volumen de diluyente B (H / 2)
- J. Vol A – Prov: Volumen de diluyente A – Dilución provisoria
- K. Vol B/3: Volumen de diluyente B / 3

Dosis reales: Número de dosis obtenidas en el congelamiento

Mot. Masal: Motilidad masal del semen post descongelamiento (Escala subjetiva: Tiene motilidad masal-No tiene motilidad masal)

% vivos: Porcentaje de espermatozoides vivos post descongelamiento

MIP: Motilidad individual progresiva post descongelamiento (Escala subjetiva: máximo, 5; mínimo, 0)

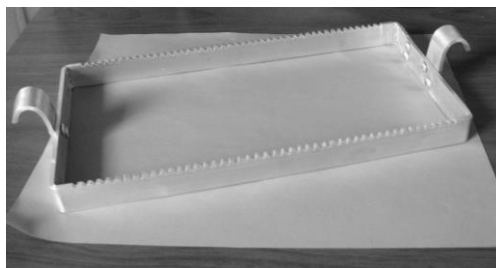
Conc esperm: Concentración espermática por dosis post descongelamiento

LISTADO DE MATERIALES PARA EL CONGELAMIENTO DE SEMEN

- BRETE DE SUJECION
- BAÑO TERMOSTATICO, GRADILLA, TUBOS DE HEMOLISIS
- MICROSCOPIO OPTICO (LAMPARITA DE REPUESTO)
- PLATINA TERMICA, PORTA Y CUBRE-OBJETOS
- VAGINA ARTIFICIAL, CAMISAS, COPITAS, BANDAS DE SUJECION, TERMO
- ESTROGENOS, JERINGA, AGUJAS
- DILUYENTE: TRILADYL, GLICEROL, HUEVO (JERINGAS 20 ml)
- PEACHIMETRO, ACIDO CITRICO 1 M, HIDROXIDO DE SODIO 1N
- CAMARA DE NEUBAUER, CUBRES
- MICROPIPETA de 10 ul, TIPS
- PROTOCOLO DE CONGELAMIENTO SEMINAL, CALCULADORA
- MECHERO O FUENTE DE CALOR
- TERMOMETROS
- PIPETAS, PROBETAS (100 y 50 ml), VASOS DE PRECIPITADO
- RECIPIENTES, BANDEJAS, TUPPERS
- PAPEL BLANCO, PAPEL DE ALUMINIO, ALGODON
- ALCOHOL, AGUA DESTILADA
- CITRATO DE SODIO 2.8%
- TERMO DE NITROGENO, NITROGENO LÍQUIDO, CANASTILLOS, ELEVADORES
- MARCADOR INDELEBLE, CINTA DE ENMASCARAR (PARA ROTULAR)
- TIJERA, PINZA PASTILLERA O DE MANO IZQUIERDA
- REGLA Y EMBUDO PARA NITROGENO LIQUIDO/ESCOBILLA PARA SUJECION

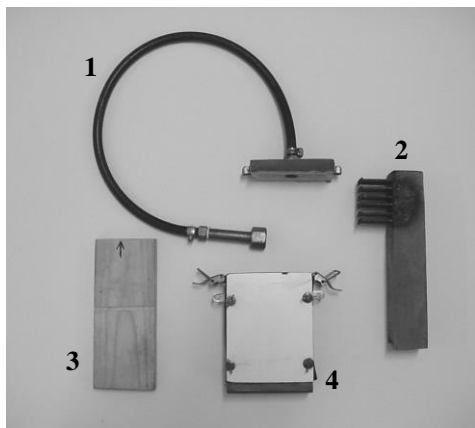
CONGELAMIENTO EN PAJUELAS

- ALCOHOL POLIVINILICO, PAJUELAS, JERINGA (5 ml) Y AGUJAS (de insulina: 1.5 cm de largo)
- PORTA PAJUELAS
- CAJA DE TELGOPOR, TACOS DE MADERA
- GRADILLA Y SOPORTE METALICO PARA PAJUELAS SEGÚN FOTOS:



CONGELAMIENTO EN PASTILLAS

- TUBO DE DIOXIDO DE CARBONO
- CAJA Y DISTINTAS PARTES PARA EL CONGELAMIENTO SEMINAL EN PASTILLAS:



1. Manguera de unión entre el tubo de dióxido de carbono-caja de congelamiento para pastillas
2. Marcador de celdas para la formación de pastillas
3. Madera para compactar el hielo seco
4. Caja de congelamiento para pastillas