



INSEMINACION ARTIFICIAL EN LA ESPECIE CAPRINA

Dr. Alejandro Gibbons
Ing. Agr. Marcela Cueto
Bioq. Marina Wolff

Reproducción & Genética
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Estación Experimental Agropecuaria Bariloche
Centro Regional Patagonia Norte

Introducción

La inseminación artificial (IA) es una técnica que permite la deposición del semen colectado y fraccionado en el tracto reproductivo de las hembras. Fundamentalmente, se emplea para multiplicar las características productivas deseables de reproductores de alto valor genético, en cualquier época del año.

Se debe tener presente que la IA es solamente una herramienta de un programa de mejoramiento genético y cuya finalidad es brindar la posibilidad de realizar un manejo amplio y dirigido de los servicios.

Las técnicas de congelamiento de semen posibilitan aún más la multiplicación y difusión de genes, al tiempo que permiten su conservación por un período ilimitado de tiempo.

El empleo del semen congelado puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al aumentar considerablemente el flujo de material genético de las cabañas hacia los hatos generales, así como facilitar el transporte de semen a nivel mundial. De esa manera, se evita el costoso traslado de los reproductores, y se disminuye el riesgo sanitario.

Anatomía y reproducción del caprino

Un conocimiento básico de la anatomía del tracto reproductivo y de la fisiología reproductiva de la hembra caprina, nos permitirá comprender con mayor facilidad el desarrollo de los próximos temas.

El aparato reproductivo de la cabra comprende los ovarios, los oviductos, el útero y la vagina. Los óvulos o huevos se originan en los ovarios. Los oviductos son pequeños conductos por donde son transportados los óvulos hasta su encuentro con los espermatozoides y por ende el lugar donde se realiza la fecundación. Una vez fecundado el óvulo, comienza una serie de divisiones celulares que conforman el embrión, el cual desciende por el oviducto hasta el útero, en donde se desarrollará la gestación. El útero presenta una diferenciación anatómica en su continuidad con la vagina que se denomina cérvix, sobre el que ampliaremos algunos aspectos en relación a la IA. La vagina es el órgano copulatorio de la hembra en cuyo externo se localiza la vulva. Las borregas y las cabras que nunca parieron presentan a nivel vaginal una estructura fibrosa denominada himen, el cual se puede palpar introduciendo el dedo por la vagina. En forma natural, se rompe al momento del parto, por lo tanto puede servir como un indicador de primera parición de la hembra.

El comienzo y duración de la época reproductiva de las cabras está supeditada a la ubicación geográfica del hato. Es prolongada en la región tropical y se reduce a medida que se incrementa la latitud. Otros factores que inciden sobre estas dos variables son las condiciones ambientales, raciales y nutricionales.

La manifestación de celo en la cabra es cíclica y estacional (otoño-invierno). El tiempo que transcurre entre un celo y otro es denominado "ciclo estral o sexual"; considerándose que su duración normal es de 19 a 21 días.

El ciclo sexual de la cabra comprende 4 períodos. El proestro es el día previo al celo. Este corto período se caracteriza por un comportamiento de inquietud de la cabra, que frente a intentos reiterados de montas por el macho, se presenta huidiza a la cópula. Los signos externos que podemos observar son: presencia de la vulva inflamada y rojiza con descarga de mucus, siendo estos signos más manifiestos en la hembra adulta que en la borrega.

El período estral (celo), que se presenta a continuación, se caracteriza por la modificación de la conducta sexual de la hembra, que acepta la monta en varias oportunidades. A su vez los signos externos a nivel vulvar son más manifiestos. Este período tiene una duración de 18 a 63 horas, siendo lo más habitual observar celo durante 24 a 36 horas. En borregas, se debe tener en cuenta que el celo es menos manifiesto y de menor duración.

Finalizado el estro se inicia una fase denominada metaestro, en la que generalmente se produce la ovulación. El último período del ciclo es el diestro que se extiende hasta que la cabra comienza un nuevo ciclo sexual; a menos que haya quedado preñada.

El ciclo estral que acabamos de describir está regulado por 4 hormonas: Folículo estimulante (FSH) y Luteinizante (LH), que se producen en una glándula ubicada en el cerebro (hipófisis anterior), y estrógeno y progesterona, producidas por el ovario.

La FSH tiene como función intervenir en la estimulación del desarrollo de los folículos del ovario para la producción de óvulos, y la LH actúa en la fase final del crecimiento de los folículos y desencadena la ovulación.

El estrógeno es liberado por los folículos que están en proceso de maduración y su incremento en sangre produce el comportamiento en celo de la cabra y por lo tanto la aceptación de la cópula.

Al producirse la ovulación, se forma a partir del folículo ovulatorio, el denominado cuerpo lúteo. Su finalidad es producir progesterona, la cual va a cumplir la función de mantener la gestación en el caso de que la hembra quede preñada. En el supuesto que la cabra no sea servida, el cuerpo lúteo va perdiendo su actividad biológica y un nuevo celo se presentará después de 19 a 21 días. Este proceso continuará durante la estación reproductiva y será interrumpido sólo por la preñez, determinadas enfermedades o una alimentación deficiente.

Por último mencionaremos la oxitocina, que se produce en la hipófisis y su finalidad es favorecer el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra y estimular la bajada de la leche.

En referencia a los machos podemos observar que poseen capacidad de servicio a lo largo de todo el año, pero presentando variaciones en su líbido y calidad seminal. La época de servicio

(otoño) incrementa su potencial reproductivo, el cual también está supeditado a los factores anteriormente mencionados para las hembras.

En los machos, la FSH interviene en la formación de los espermatozoides, y la LH actúa a nivel del testículo estimulando la producción de andrógenos (testosterona), y en forma conjunta, promueven la maduración de los esperamatozoides.

La testosterona interviene en el deseo sexual o líbido, las características externas de conformación y el comportamiento sexual de los machos.

El conocimiento de la actividad reproductiva de las cabras le permitirá al productor realizar un buen manejo de los servicios a corral o utilizar la IA, para identificar la paternidad de sus crías.

Algunos aspectos que se deben tener en cuenta:

- Se debe recordar que durante la época de servicios el celo se presenta cada 19 a 21 días.
- La mayoría de las cabras permanece en celo (acepta la cópula) durante 18 a 36 horas.
- La ovulación generalmente ocurre entre las 6 horas antes y 12 horas después de finalizado el celo (la hembra no acepta más la monta).

Detección de celos

La identificación de los celos puede realizarse a corral o a campo. En el primer caso debe trabajarse con pocos animales a la vez (20 a 25 hembras con 2 retajos o machos con delantal) y debe tenerse en cuenta que los celos de las borregas pueden pasar inadvertidos, debido a que son poco manifiestos. Una buena práctica es cambiar los machos buscadores de celo cuando manifiestan poco interés sexual. La identificación de celo, que se realiza a la mañana, debe comenzar una vez que el hato no está sumido por el frío.

Otra forma es usar los retajos a campo, colocándoles chalecos marcadores o simplemente pintándoles el pecho con ferrite. La proporción de machos respecto a las hembras debe ser de 1 a 20.

Servicio dirigido

Cuando se desea conocer la paternidad de las crías se puede realizar:

- Servicio a corral: es suficiente con un solo servicio, en el momento que se identifica la hembra en celo.
- Programa de IA: la inseminación se realizará a las 12 horas de detectado el celo. Puede repetirse cada 12 horas durante el tiempo que la cabra acepte la monta de un retajo o de un macho con delantal.

Colección y evaluación del semen

La evaluación reproductiva de un macho se debe realizar determinando su capacidad de realizar la monta con un eyaculado de semen de buen poder fecundante.

Cuando se realiza un programa de extracción de semen para su utilización en fresco, congelamiento o para realizar un examen seminal, se debe considerar el estado nutricional, sanitario y realizar una correcta revisión clínica.

La técnica más recomendada para obtener una colecta de semen es el empleo de una "vagina artificial", que provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación. Consiste en una parte externa rígida, por ej. caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5 cm), y una camisa interna de látex. Esta se repliega y asegura sobre los extremos del tubo externo con bandas elásticas formando, entre la cubierta y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremos de la vagina, se adosa un tubo colector de vidrio.

La vagina se carga hasta sus 2/3 partes con 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 38-40 °C. 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 recolección del semen se realiza en un lugar limpio y libre de polvo. Se lava el prepucio con solución fisiológica y recortan los pelos prepuciales, para disminuir la contaminación del semen.

Los machos caprinos generalmente se acostumbran con facilidad a realizar la eyaculación en la vagina artificial. La técnica consiste en realizar la desviación manual del pene en el momento en que el macho realiza la monta sobre una hembra inmovilizada (foto 1). El tubo colector debe protegerse de los cambios bruscos de temperatura durante toda la operación y hasta su colocación en un baño de agua a 36 °C.

Cuando los machos no manifiestan intenciones de montar, se puede aplicar a una cabra no preñada, una inyección intramuscular de 0.1 cc de Progynon Depot (1 mg de valerato de estradiol) (lab. Schering, Argentina); las hembras tratadas presentarán celo 48 horas después de la aplicación, siendo necesario repetir la aplicación día por medio para mantener la inducción.

Cuando se inicia la época de obtención de semen, y si los animales no han estado previamente en servicio, se recomienda no utilizar los primeros eyaculados para el congelamiento, para producir una remoción de las reservas espermáticas viejas. En el caso en que los machos estén en servicio, es recomendable darles un descanso sexual de una semana, antes de iniciar las colectas seminales.

Los machos tienen capacidad de preñar a lo largo de todo el año, aunque su capacidad de servicio (número de hembras servidas por día) y su calidad espermática es menor en primavera y verano, respecto a la época de servicios de otoño.

La frecuencia de obtención de semen está supeditada a cada macho en particular. Para un programa de congelamiento se recomienda obtener uno o dos eyaculados diarios, durante 4-5 días seguidos y dar descansos de 2-3 días.

Una vez obtenido el semen, se lo debe colocar en un baño María a 36 °C, registrándose volumen, densidad y color. Una pequeña gota sobre un portaobjetos entibiado nos permite observar el grado de movimiento en masa o motilidad masal, que nos da una estimación del porcentaje de espermatozoides vivos y su vigor. El volumen, el porcentaje de espermatozoides vivos y su concentración varía entre individuos y aún entre los eyaculados de un mismo animal. Los valores promedio del eyaculado caprino son: 1 cc, 85% y 3500 millones de espermatozoides por mililitro, respectivamente.

Inseminación artificial

Los programas de IA y mejoramiento genético están normalmente destinados a las cabras de alto valor genético de la cabaña o establecimiento. Antes de incorporar los animales a un programa de inseminación, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos de nutrición, sanidad y reproductivos:

- Las hembras deben tener al menos 2 puntos de condición corporal (CC) a la inseminación. La CC es un valor subjetivo de la gordura de los animales. Consiste en medir la deposición grasa de los músculos lumbares, situados por debajo de las vértebras lumbares (máximo, 5; mínimo, 0).
- Las cabras estarán libres de enfermedades y parásitos.
- El destete de los cabritos debe realizarse 6 a 8 semanas antes de la inseminación.
- Se refugarán las cabras "viejas" y con problemas de ubre (pezones ciegos, ubres cortadas, mastitis), como así también aquellas cabras que no hubieran retenido servicio por 2 años consecutivos.

Métodos de sincronización de celos

Los métodos de sincronización de estros constituyen una herramienta de gran utilidad en los servicios dirigidos -a corral o a campo- y en los programas de IA, ya que facilitan el manejo de los animales al evitarse el encierre diario durante 21 días para la detección de celos naturales. Se pueden dividir en: 1) naturales y 2) farmacológicos.

1) Métodos naturales: En Patagonia, en el sistema de cría donde los machos permanecen separados de las hembras fuera de la época reproductiva, se presenta al inicio de la temporada de servicio, una manifestación de celos concentrados (alrededor del 50 al 60% de las hembras del hato) entre el 8vo y 12vo día post introducción de los machos en el hato. Este estímulo sexual se denomina "efecto macho" y puede ser empleado como "un método natural y económico" para realizar un servicio dirigido a corral o implementar una IA. Los celos que se manifiestan en forma previa, suelen ser de baja fertilidad y las cabras que no quedan preñadas repiten celo, fértil, a los 5 a 7 días. Después del período de concentración de celos, se presenta un porcentaje de celo diario entre el 0 al 3% y de una buena fertilidad.

El "efecto macho" puede utilizarse en combinación con otros métodos de sincronización de celos, en el inicio de la estación reproductiva, para asegurarse que todas las hembras estén ciclando al comienzo del tratamiento hormonal. En este caso, la introducción de los machos en el hato debe realizarse unos 20 días antes de iniciar los trabajos de sincronización de estros.

2) Métodos farmacológicos: Tienen la ventaja de concentrar un alto porcentaje de celos en un período corto de tiempo, lo que facilita la programación y realización de los trabajos de IA. Haremos referencia a los 2 más utilizados: a) las esponjas intravaginales con progestágenos y b) la progesterona inyectable.

2a) Esponjas intravaginales con progestágenos: simulan la acción de un cuerpo lúteo mediante la liberación lenta de progesterona. Se colocan en la vagina de la hembra por 15-17 días, período de tiempo que iguala el tiempo de vida media del cuerpo lúteo.

Este método permite alcanzar una elevada concentración de celos y llevar a cabo la IA a un tiempo fijo luego de finalizado el tratamiento hormonal (IA sistemática). Asimismo concentra los estros fuera de la estación reproductiva, permitiendo la producción de cabritos en contra-estación.

Debido a que hay un porcentaje variable de cabras que no responden al tratamiento o que no presentan la ovulación sincronizada con el resto, como así también a la alteración del transporte espermático producida por efecto de los progestágenos, se aconseja la utilización de progestágenos en forma combinada con una dosis de Gonadotrofina Coriónica equina (eCG).

La eCG se administra por inyección intramuscular al momento de retirar las esponjas, en la estación reproductiva; o 48 horas antes del retiro, en el anestro estacional. Mejora la sincronía de los celos y de las ovulaciones. Las dosis utilizadas de eCG varían entre 200 y 400 UI, dependiendo fundamentalmente del peso corporal, de la raza y de la época del año, aconsejándose probar en principio la dosis menor. Dosis elevadas de eCG ocasionan gestaciones múltiples, generando altas pérdidas de animales por mortalidad perinatal.

Las esponjas intravaginales pueden utilizarse en combinación con el "efecto macho", en reemplazo de la utilización de eCG. En este caso, los machos se introducen en el hato 48 horas antes del retiro de las esponjas.

Colocación y retiro de las esponjas:

1. Antes de proceder a la colocación de las esponjas, es conveniente rociarlas externamente con un antibiótico en aerosol sin corticoides.
2. La esponja se comprime e introduce en el extremo biselado del aplicador, cuidando que el hilo cuelgue hacia afuera.
3. El vástago se coloca dentro del aplicador por el extremo libre hasta que haga contacto con la esponja.
4. El aplicador es humedecido externamente con vaselina.
5. Para facilitar la maniobra de colocación de la esponja, es conveniente que la hembra esté parada en posición natural. El aplicador y vástago son introducidos suavemente hasta el fondo de la vagina.
6. El tubo aplicador se retira unos 3-4 cm manteniendo el vástago en su sitio, hasta liberar la esponja.
7. Se recomienda cortar los hilos de las esponjas de tal manera que sobresalgan 2-3 cm de la vagina de la hembra (para evitar pérdidas de esponjas).

Para retirar las esponjas, se tira firme pero suavemente del hilo hacia atrás, manteniendo una leve inclinación hacia abajo. Si algún animal no presentase el hilo visible, será aconsejable verificar por medio de un vaginoscopio, que la esponja no se encuentre en el interior de la vagina.

No se recomienda utilizar esponjas en las cabrillas de primer servicio ya que, debido a la necesidad de romper el himen durante su colocación, un gran número de animales presentará los laterales de la esponja adheridos a las paredes internas de la vagina al momento de su retiro. Una posibilidad sería romper el himen con el aplicador de esponjas, y colocar las esponjas una semana después.

El costo de sincronización de estros mediante el empleo de esponjas y eCG es de 2.5 a 3\$ por cabra.

En las cabras de raza Angora, hemos empleado esponjas intravaginales de 60 mg de Acetato de Medroxiprogesterona (MAP) durante 17 días, con la incorporación de un "efecto macho" (4% de chivos retajos) 48 horas antes de retirar las mismas. Los celos se presentaron en el 80 al 90 % de las cabras entre las 24 y 72 horas del retiro de las esponjas.

Existe una variante de este método, que nos permite reducir el tiempo de permanencia de las esponjas en la vagina de la hembra hasta 11 días, mediante la aplicación de 100 ug de cloprostenol (prostaglandinas) en el día 9 y correspondiente dosis de eCG 48 horas antes del retiro de los pesarios. La aplicación de prostaglandinas en el día 9, acorta la actividad biológica de los cuerpos lúteos que aún permanecen funcionales.

2b) Progesterona inyectable: otra alternativa consiste en la utilización de 2 inyecciones intramusculares de progesterona (20 mg c/u), distanciadas entre sí 48 horas, con la incorporación del 4% de retajos, en el momento de aplicar la primera dosis. Los celos se presentan agrupados entre el 3er y 4to día de la segunda aplicación, presentándose celos en el 50-80% de las cabras. La alta variabilidad en la respuesta a la sincronización con progesterona está relacionada, entre otros factores, al estado nutricional del hato.

Sin embargo, este método nos permite reducir el costo de sincronización de estros.

Manejo del semen fresco

La IA con semen fresco hace referencia a la utilización inmediata del eyaculado entre su obtención y su deposición en el tracto reproductivo de una hembra. Una vez que el semen es analizado y considerado apto, debido a que cumple con los requisitos mínimos para ser utilizado, se puede diluir o bien fraccionar hasta lograr una concentración de 100 millones de espermatozoides por dosis y un volumen máximo de 0.25 cc. Por ej., con un eyaculado de una concentración de 3000 millones/cc de semen, se pueden inseminar 30 hembras.

El semen puede utilizarse puro, sin diluir, fraccionando 0.03 cc por cabra (1 cc/30); o diluido, mediante el agregado de un diluyente en base a leche descremada de vaca al 10% y glucosa al 1%. La dilución del semen aumenta su período de conservación (valor de referencia: aprox. una hora entre la obtención del eyaculado y la última inseminación), al mismo tiempo que facilita su dosificación. Por ej., considerando los valores anteriores, mediante la adición de 2 cc de diluyente, se completan 30 dosis de inseminación de 0.1 cc por animal.

El diluyente es calentado previamente a 92-94 °C durante 10 minutos, entibiándose luego a 28-30°C. Este se agrega por las paredes del tubo y se mezcla realizando movimientos oscilatorios.

Es muy importante verificar la motilidad masal del semen cada 5 o 6 inseminaciones, de manera de asegurarse que conserve su capacidad fecundante y no haya sido alterado por algún accidente técnico que se haya cometido en forma desapercibida (contaminación con agua, golpe térmico, etc.).

El semen fresco caprino diluido y refrigerado a 5 °C, no debe ser conservado por períodos de tiempo superiores a las 8-12 horas, debido a que pierde su poder fecundante. La dosis de inseminación de referencia con semen refrigerado es de 150 millones por cabra.

Manejo del semen congelado

El descongelamiento del semen se realiza a una temperatura de 36 °C. Una vez descongelado, es conveniente proceder a su rápida utilización. Si el semen fue congelado en pastillas, su descongelamiento puede llevarse a cabo en tubos de hemólisis secos mantenidos a

esa temperatura en baño de agua.

Las dosis congeladas en pajuelas se descongelan directamente en baño de agua. Luego de 30 segundos, la pajuela se retira del baño y se seca con una toalla de papel descartable. Se le cortan ambos extremos para proceder a su vaciado, ya sea en un tubo de hemólisis, o directamente en la vaina de inseminación. Cabe recordar que los canastillos no deben elevarse más allá del nivel de la boca del termo durante las maniobras de descongelamiento.

No debemos olvidar que se debe trabajar en un ambiente climatizado a 25 °C.

Los termos conservadores de nitrógeno poseen 2 paredes (externa-interna) con una cámara de vacío intermedia, que evita la pérdida de frío. La temperatura del termo es estable en su interior, mientras se disponga como mínimo de 12-14 cm de nivel de nitrógeno. Para conocer el volumen del mismo, se puede utilizar una varilla de madera pintada de negro. Una vez sumergida por 30 segundos, se retira y se agita hasta observar una capa blanca de congelación, cuya altura es igual a la del nitrógeno líquido en el interior del termo. Se debe tener precaución debido a que a medida que el volumen disminuye, la pérdida de nitrógeno por evaporación es mayor.

Por último se recomienda tener suma precaución en el manejo del nitrógeno líquido debido a las posibilidades de daño físico por contacto directo o indirecto con las bajas temperaturas.

Inseminación artificial cervical

En la especie caprina, a diferencia de la ovina, tanto la IA con semen fresco como con semen congelado, puede realizarse por vía cervical. Debido a la dificultad que presenta el cuello uterino para ser traspuesto por la vaina de inseminación, así como a la reducción de la viabilidad espermática producida por el proceso de congelamiento y descongelamiento, la dosis de inseminación con semen congelado por la vía cervical es mayor que con semen fresco (200 y 100 millones de espermatozoides, respectivamente).

El lugar donde se practica la inseminación debe estar limpio y libre de corrientes de aire, a una temperatura ambiental de 20-25 °C. Las cabras se sujetan en un mínimo de tiempo, evitando causar stress innecesario en los animales.

La cabra debe estar en posición de pie, en un brete con cepo y con ligera inclinación hacia adelante. El operador puede realizar la IA ubicándose en una fosa o bien tener el brete elevado para facilitar el trabajo. Otra posibilidad es que un ayudante presente la cabra con los cuartos traseros elevados sobre una baranda o riel.

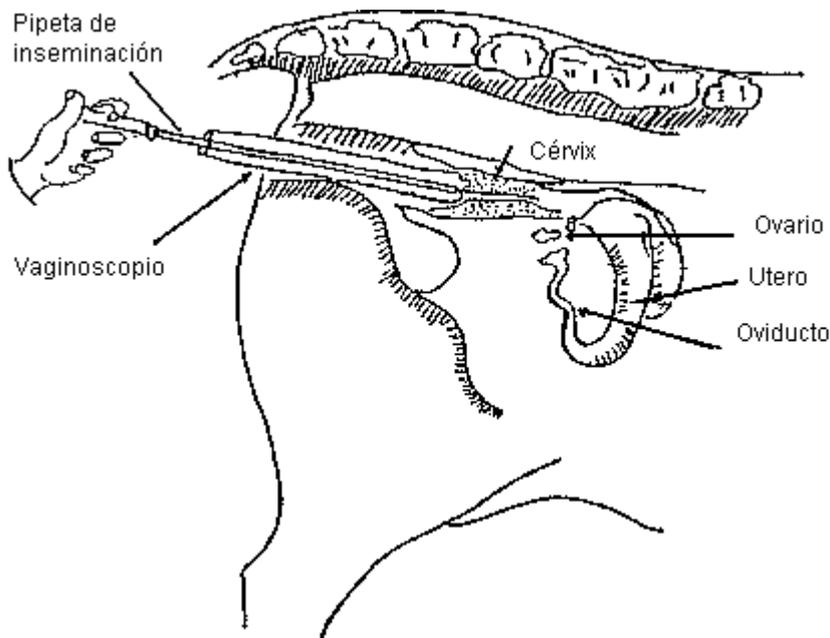
Se limpia la vulva con una toalla de papel descartable y se aplica una muy pequeña cantidad de vaselina para facilitar la introducción del vaginoscopio. Con una mano se sujeta la cola de la cabra y con la otra se introduce el vaginoscopio lentamente y en dirección dorsal respecto al animal; una vez que penetra unos centímetros se lo debe dirigir en dirección horizontal hasta el fondo vaginal en donde se busca el orificio de entrada al útero (cérvix). Una dificultad para su

identificación es la presencia de moco abundante, que puede absorberse y eliminarse mediante una pipeta plástica con jeringa. Una vez realizada esta maniobra se solicita el semen a un auxiliar. La punta de la vaina de inseminación se guía hasta la entrada del orificio uterino, y se introduce mediante suaves movimientos giratorios, evitando lesionar la mucosa, hasta donde se presente resistencia (figura A).

En algunas cabrillas, la colocación del vaginoscopio es muy traumática, por lo tanto se recomienda realizar la IA introduciendo únicamente la pipeta de inseminación por la vulva y descargando el semen en el fondo de la vagina.

Una vez descargado el semen es conveniente que la hembra permanezca durante 2 ó 3 minutos en la posición de inseminación, y luego en un brete contiguo a los machos por un par de horas.

Figura A. Inseminación artificial por vía vaginal



Inseminación artificial mediante endoscopia

La endoscopia es una técnica que mediante un sistema óptico introducido en el interior del animal por punción del abdomen y una fibra flexible de vidrio para la propagación lumínica, permite realizar visualizaciones internas de órganos y sin recurrir a la cirugía.

Cuando se realiza IA, esta técnica se denomina laparoscopia debido a que la observación se realiza atravesando la pared abdominal para la visualización de los órganos reproductivos internos. El acceso con la dosis de semen se realiza a través de un pequeño orificio que se efectúa con un trócar en proximidad de la glándula mamaria (figura B).

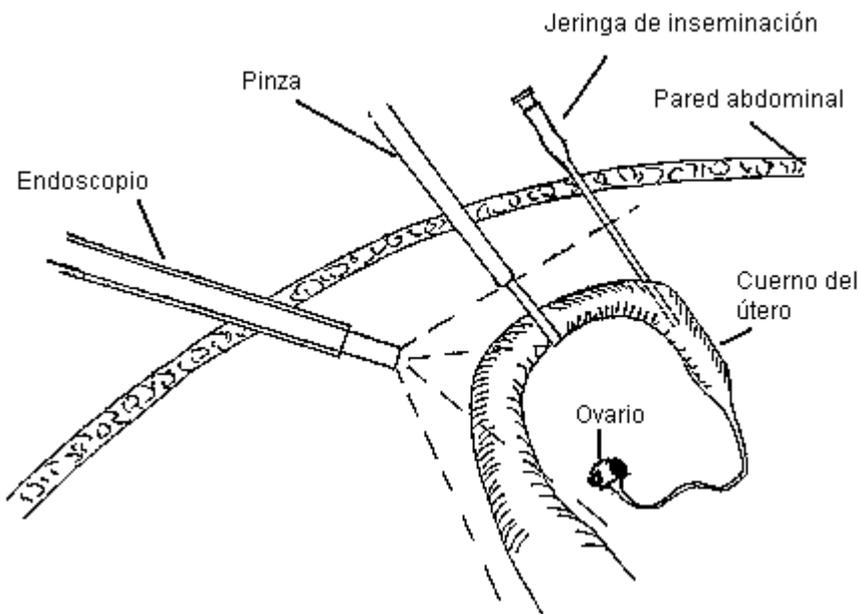
La inseminación consiste en inyectar la mitad del semen en cada cuerno uterino, mediante una pipeta que dispone de una fina aguja en uno de sus extremos.

Esta técnica de inseminación mediante laparoscopia es utilizada ampliamente en la especie ovina, donde los porcentajes de preñez con semen congelado por vía cervical son del 20-25%, debido a la dificultad que presenta el cérvix para ser traspuesto con la pipeta de inseminación.

En el caprino está siendo utilizada con la doble finalidad de elevar el porcentaje de preñez respecto a la IA por vía vaginal y de reducir el número de espermatozoides por dosis de inseminación.

Otra ventaja que presenta la IA por laparoscopia es que permite realizar la IA a un tiempo fijo con respecto al retiro de las esponjas (IA sistemática), alcanzándose una fertilidad aceptable.

Figura B. Inseminación artificial por laparoscopia



A continuación se presentan valores de eficiencia reproductiva para distintas alternativas de IA (valores de referencia para razas lecheras):

SEMEN	VIA	DOSIS	IA	PREÑEZ
FRESCO	Cervical	100 mill	Con detección de celo	60-70%
CONGELADO	Cervical	200 mill	Con detección de celo Sistemática*	50% (±10%)
	Laparosc.	50 mill	Con detección de celo Sistemática**	55% (±10%)

* 45 horas post retiro de las esponjas intravaginales

** 55 horas post retiro de las esponjas intravaginales

Congelamiento del semen caprino

Se describe la serie de procedimientos que se realizan para el congelamiento del semen caprino.

a) Preparación del diluyente seminal

Se utiliza leche descremada de vaca en polvo al 10%, más glucosa al 1%, diluidos en agua destilada. Ej. 50 ml de agua destilada, 5 g de leche descremada, 0.5 g de glucosa. El diluyente se mantiene a 92-94 °C en baño de agua durante 10 minutos. Cumplido este tiempo, se entibia a 36°C y se agrega penicilina y estreptomina (1000 UI y 1 mg por ml de diluyente, respectivamente). El volumen total se divide en 2 fracciones iguales: DILUYENTE A -sin agregado de glicerol- y DILUYENTE B -con agregado de glicerol al 12%- . Ej. para 25 ml de diluyente B, la cantidad de glicerol a agregar es de 3 ml. Se entibia el glicerol y se agrega al diluyente aún caliente para lograr una buena homogeneización. El diluyente A permanece a 36 °C, mientras que el diluyente B se coloca en heladera a 5 °C (ES IMPORTANTE QUE LA HELADERA NO ENFRIE POR DEBAJO DE ESTA TEMPERATURA).

El pH del diluyente debe mantenerse entre 6.8 y 7.2. Si se está trabajando en un ambiente caluroso, es conveniente colocar la solución A en la heladera para evitar su acidificación, y entibiarla poco antes de su utilización.

b) Obtención y evaluación del semen

Una vez que el semen fue recolectado en vagina artificial, se lo mantiene en un baño de agua a 36 °C durante su evaluación. Se observa una gota de semen al microscopio con 100 aumentos sobre portaobjetos templado por platina térmica. Se puede tener una idea de la calidad del semen por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas seminales (motilidad masal). La motilidad se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala subjetiva (0, mínimo; 5, máximo). Únicamente si la motilidad masal es de 4 o mayor se procede a congelar el

semen.

En todo momento es importante que el semen se mantenga protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua, radiación solar directa e impurezas. Por lo tanto, todo el material debe estar limpio y seco y a la misma temperatura del semen.

c) Determinación de la concentración espermática

La determinación de la concentración espermática se realiza en cámara de Neubauer. Para el cargado de la cámara de recuento espermático se tendrán en cuenta los siguientes pasos:

- Adherir el cubreobjetos sobre la cámara humedeciendo sus bordes con vaselina o saliva 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 semen con la pipeta para glóbulos rojos, que debe estar templada y perfectamente seca, hasta la marca de 0.25.
- Limpiar el extremo de la pipeta cuidando de no variar el engrase.
- Aspirar el líquido de dilución (puede ser agua común) hasta la marca 101.
- Tapar con los dedos ambos extremos de la pipeta y agitar horizontalmente en forma suave unas 30 veces.
- Desechar las primeras gotas.
- Colocar el extremo de la pipeta en el borde del cubreobjetos y dejar que la cámara se cargue por capilaridad. El líquido no debe pasar a los surcos laterales ni deben quedar glóbulos de aire o zonas sin cargar.
- Dejar reposar unos minutos antes de iniciar el recuento.

La cámara también puede cargarse con micropipeta, realizando con una dilución del 5 microlitros de semen en 2 cc de agua.

Se coloca la cámara bajo observación microscópica (100 o 200 aumentos). Si la distribución de los espermatozoides no es homogénea, se repite la operación de carga. Se cuenta el número de espermatozoides en un cuadrado "grande" (sin divisiones internas) 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/cc se calcula multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrados por 12.800.000.

d) Centrifugación del semen con la solución de lavado

La especie caprina presenta ciertas particularidades en la composición de su plasma seminal. Una de ellas es la existencia de una fracción proteica (BUIII) procedente de las glándulas bulbouretrales que interacciona con la leche utilizada en el diluyente produciendo inhibición de la motilidad de los espermatozoides. Para evitar los efectos perjudiciales de esta sustancia, algunos investigadores sugieren "lavar" el semen, es decir separar y eliminar el plasma seminal mediante centrifugación antes de mezclar el semen con el diluyente. Esta metodología se

emplea en las razas caprinas lecheras.

Sin embargo, nosotros hemos obtenido buenos resultados de fertilidad en la raza Angora, sin necesidad de remover el plasma seminal. En este caso, una vez cargada la cámara de Neubauer, se realiza una "dilución provisoria" del semen con el diluyente A (con igual al volumen del eyaculado recolectado), de tal manera de preservarlo mientras se determina la dilución final.

Como solución de lavado puede emplearse Citrato de Sodio al 2.8% (2.8 g de Citrato de Sodio en 100 ml de agua destilada). El pH de la solución debe ser de 6.8-7.2. Se debe controlar periódicamente tanto el pH de la solución de lavado como el del diluyente.

Para proceder a la dilución de los líquidos seminales, se le agregan 10 ml de la solución de lavado al semen, y se centrifuga por 10 minutos a 2000 rpm. Eliminado el sobrenadante, por medio de una pipeta, se reitera este procedimiento, tratando de que la masa de los espermatozoides que se observa en el fondo del tubo se disuelva en la solución de lavado. Es importante que el Citrato de Sodio esté a igual temperatura que el semen. Por lo tanto, el primer lavado se realiza a 36 °C, y el segundo lavado, teniendo en cuenta que durante el centrifugado se pierde temperatura, se realiza a 20-25 °C (temperatura de laboratorio).

e) Primera dilución (agregado de la solución A)

Se calcula el volumen de diluyente que se debe agregar al semen de acuerdo a las indicaciones que figuran en la planilla en la hoja anexa.

Si no se realiza la dilución del plasma seminal, se agrega la solución A a 36 °C, mediante una pipeta templada.

Si se realiza el lavado del semen, al número total de espermatozoides en el eyaculado se le descontará un 10% de su valor (pérdida estimada de espermatozoides que se produce al remover el líquido sobrenadante). En este último caso, se procede al agregado del diluyente a 20-25 °C.

f) Descenso de la temperatura y tiempo de estabilización a 5 °C

Una vez agregado el diluyente A, se procede al enfriamiento del semen diluido, desde la temperatura a la cual se agregó el diluyente, hasta 5 °C. El enfriamiento se realiza a razón de unos 2°C cada 3 minutos. El semen diluido debe permanecer a esta temperatura en heladera por un tiempo de 45-60 minutos, antes de proceder al agregado del diluyente B.

g) Segunda dilución (agregado de la solución B)

El diluyente B se agrega fraccionado en 3 partes iguales, a intervalos de 10 minutos, homogeneizando cada vez. A los 10 minutos de agregada la última fracción de solución B, se

comienza con el acondicionamiento del semen para su congelamiento. Es recomendable colocar la pipeta en la heladera con anterioridad a esta dilución.

h) Acondicionamiento del semen para su congelamiento

El semen se puede congelar en pajuelas en vapores de nitrógeno líquido (a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), o en pastillas en hielo seco (dióxido de carbono sólido a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$). El semen congelado por cualquiera de estos 2 métodos, se conserva en termo de nitrógeno líquido.

El congelamiento en pastillas es más simple que en pajuelas, pero estas últimas permiten ser rotuladas individualmente y son más fáciles de manipular durante la IA.

Es importante realizar el congelamiento en un ambiente a baja temperatura y homogeneizar bien el semen durante esta operación, a fin de obtener dosis de similar calidad seminal. Se tendrá especial cuidado en la identificación de las partidas de semen.

1. Congelamiento del 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 moldean celdas en su superficie, mediante un clavo previamente calentado a la llama.

El semen se retira de la heladera en un baño de agua a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se contará además con otro recipiente conteniendo diluyente remanente como refrigerante, para mantener las pipetas de vidrio a baja temperatura.

Una vez pipeteado el semen, se vuelcan desde la pipeta, en forma rápida y sucesiva, volúmenes de 0.2 ml (± 4 gotas) por celda, tratando de que el tiempo transcurrido entre el goteo de la primera pastilla y la última no supere el minuto. Las dosis de semen permanecen allí por 1-2 minutos, hasta que la superficie de las pastillas se opaque. Luego se trasladan al termo de nitrógeno líquido.

2. Congelamiento del semen en pajuelas

Las pajuelas, el alcohol polivinílico y una jeringa con aguja de 1.5 cm se colocan en la heladera previo al congelamiento. 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. Se secan con papel absorbente, se crea una cámara de aire de 1.5 cm en el extremo sin tapón con jeringa con aguja de la medida y se sella dicho extremo con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa que contenga alcohol polivinílico. Inmediatamente se sumergen en recipiente con agua a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Es necesario contar con una caja de tergopor, 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 marco de aluminio, de 11 cm, 7 cm y 2 cm de altura, respectivamente. El marco de aluminio sobre los tacos de madera y la gradilla alcanzará -con respecto al fondo de la caja- 20 cm de altura (1º nivel), mientras que sobre la gradilla será de 9 cm (2º nivel).

Se vuelca nitrógeno líquido en la caja de tergopor hasta 6 cm respecto del fondo. Se tapa por unos minutos hasta que cese la ebullición y se enfríe su interior. Luego de secar las pajuelas, éstas se colocan horizontalmente en el marco de aluminio, cuidando de que no se toquen entre sí. Las pajuelas dispuestas sobre el marco se ubican en el interior de la caja de tergopor en el 1º nivel, por 2 minutos. Seguidamente se destapa la caja y las pajuelas se ubica durante 3 minutos en el 2º nivel (luego de haber retirado los tacos de madera). Finalmente las pajuelas se vuelcan en el nitrógeno y se almacenan en portapajuelas en un termo de nitrógeno líquido.

i) Descongelamiento y evaluación de la partida seminal

Se procede al descongelamiento del semen según lo expresado con anterioridad (ver Manejo del semen congelado).

La evaluación de un 10% de las dosis congeladas nos permite determinar la aceptación de la partida de congelamiento. Es importante realizar varias observaciones de la misma pajuela o pastilla.

A los 5 minutos de incubación a 36°C, la evaluación de motilidad masal se lleva a cabo bajo (100 aumentos) en un portaobjetos templado sobre platina térmica. Luego se coloca una gota de semen entre porta y cubreobjetos templados para estimar el porcentaje de espermatozoides vivos y la motilidad individual progresiva (velocidad de desplazamiento hacia adelante de los espermatozoides vivos: 0, mínimo; 5, máximo).

Para aceptar una partida seminal, las pajuelas o pastillas deben poseer:

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

j) Descongelamiento del semen para la IA

El descongelamiento del semen se lleva a cabo en baño de agua a 36°C. El contenido de la pajuela o pastilla se vuelca en un tubo de hemólisis y se carga en la jeringa de inseminación.