



# **OBTENCION, PROCESAMIENTO Y CONSERVACION DEL SEMEN OVINO**

**Grupo de Reproducción - INTA Bariloche**

**Ing. Agr. M. Cueto; Méd. Vet. A. Gibbons; Méd. Vet. J. García Vinent;  
Bioq. M. Wolff y Méd. Vet. J. Arrigo**

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

## **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 .....	4
MANIPULACION Y EXAMINACION DEL SEMEN .....	5
Color del semen .....	5
Motilidad de los espermatozoides .....	6
Volumen del semen .....	6
Determinación de la concentración espermática .....	6
CONGELAMIENTO DE SEMEN .....	8
Acondicionamiento del semen para su congelamiento .....	10
DESCONGELAMIENTO DEL SEMEN .....	12
MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN CONGELADO .....	13
CONSERVACION DEL SEMEN FRESCO, ENFRIADO Y REFRIGERADO .....	13

---

---

## **INTRODUCCION**

La obtención y fraccionamiento del semen para su utilización en fresco de un carnero genéticamente superior, 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 de esta manera el costoso traslado de los reproductores, y se disminuye el riesgo sanitario.

Por último, es también 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 anomalías físicas.

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 igualmente en cuenta todos los aspectos que hacen al manejo de los mismos. Aquellos tratamientos que provoquen stress en los machos tales como esquila, transporte y acostumbamiento 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 extracción 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. Cuando el semen es colectado por electroeyaculación suele presentar contaminación con orina, obteniéndose volúmenes mayores pero con menor concentración espermática. Por lo tanto sólo se recomienda su empleo cuando los machos no puedan ser entrenados para la recolección con vagina artificial, y para su utilización en IA con semen fresco.

Los machos seleccionados deben ser entrenados para saltar en vagina artificial en presencia de un operador. En la época reproductiva se facilita el entrenamiento, dado que el incremento del interés sexual disminuye la inhibición del carnero a realizar la monta en presencia del hombre.

Para el entrenamiento, se contará con una hembra en celo. El mismo podrá inducirse inicialmente por una inyección diaria intramuscular de 1 mg de valerato de estradiol en 2 ml de aceite (por ejemplo, puede diluirse una ampolla de 1 ml de Progynon Depot, Lab. Schering, conteniendo 10 mg de valerato de estradiol, en 19 ml de aceite comestible). Las hembras tratadas presentarán celo 48 horas después de la aplicación, siendo necesario repetir la aplicación día por medio para mantener la inducción.

Es aconsejable seleccionar una oveja de temperamento tranquilo para facilitar el entrenamiento.

Asegurando la hembra en un cepo se facilitará la recolección.

## **RECOLECCION DEL SEMEN POR VAGINA ARTIFICIAL**

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la oveja 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. La misma 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.

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 tergotop.

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.

La recolección del semen se hará en un lugar limpio y libre de polvo. Se lavará la panza del macho, como así también se limpiará el prepucio y recortarán los pelos prepuciales para evitar la contaminación del semen.

Asegurada la oveja en el cepo, 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 °C con respecto al piso, debiendo estar preparado para una monta y eyaculación veloz. Cuando el macho monta, el pene se desvía lateralmente para ser enfrentado 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, seguido de un descanso de 2-3 días, mantiene la calidad y cantidad de semen.

## **MANIPULACION Y EXAMINACION DEL SEMEN**

Luego de su recolección, es importante que en todo momento, 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 plástico, estará esterilizado 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 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/ml.

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

- Razones técnicas: incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un gran número de hembras (uso intensivo del padre).
- Razones biológicas: proveer a los espermatozoides, nutrientes y protección contra el enfriamiento y congelamiento.

### **Color del semen**

El color del semen se observa en primer término, debiendo el mismo ser blanco-lechoso o cremoso pálido. El color rojizo indica presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho.

## **Motilidad de los espermatozoides**

Habiendo homogeneizado el eyaculado por agitación del tubo de recolección, se retira una gota de semen con una pipeta Pasteur entibiada y se coloca sobre portaobjetos templado bajo 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 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 de 3 o mayor.

Por otro lado 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 sería conveniente desecharlos.

## **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 obtienen eyaculados de aproximadamente 1 ml, que varían según edad, tamaño y condición corporal del animal, frecuencia de colección, y destreza del operador.

## **Determinación de la concentración espermática**

Hay distintos métodos que permiten la determinación de la concentración espermática, entre ellos 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 tres piezas: a) una pieza de vidrio en la que se encuentra labrado bajo relieve el cuadrículado en que se depositará el material a examinar; b) un cubreobjetos específico que montado sobre la pieza anterior formará la cámara propiamente dicha y c) una pipeta de recuento de glóbulos rojos, con la que se tomará la muestra y en la que se realizará la dilución. La cámara de conteo es un portaobjetos de vidrio grueso con 2 cuadrículas situadas a un lado y otro (superior e inferior) del centro de la cámara. Cada cuadrícula presenta en sus extremos o cuadrantes, 4 grupos de 16 cuadrados cada uno (sin divisiones internas) (ver diagrama). Las dimensiones de los cuadrantes de 1 mm de lado por 0.1 mm de profundidad, determinan un volumen de  $0.1 \text{ mm}^3$ .

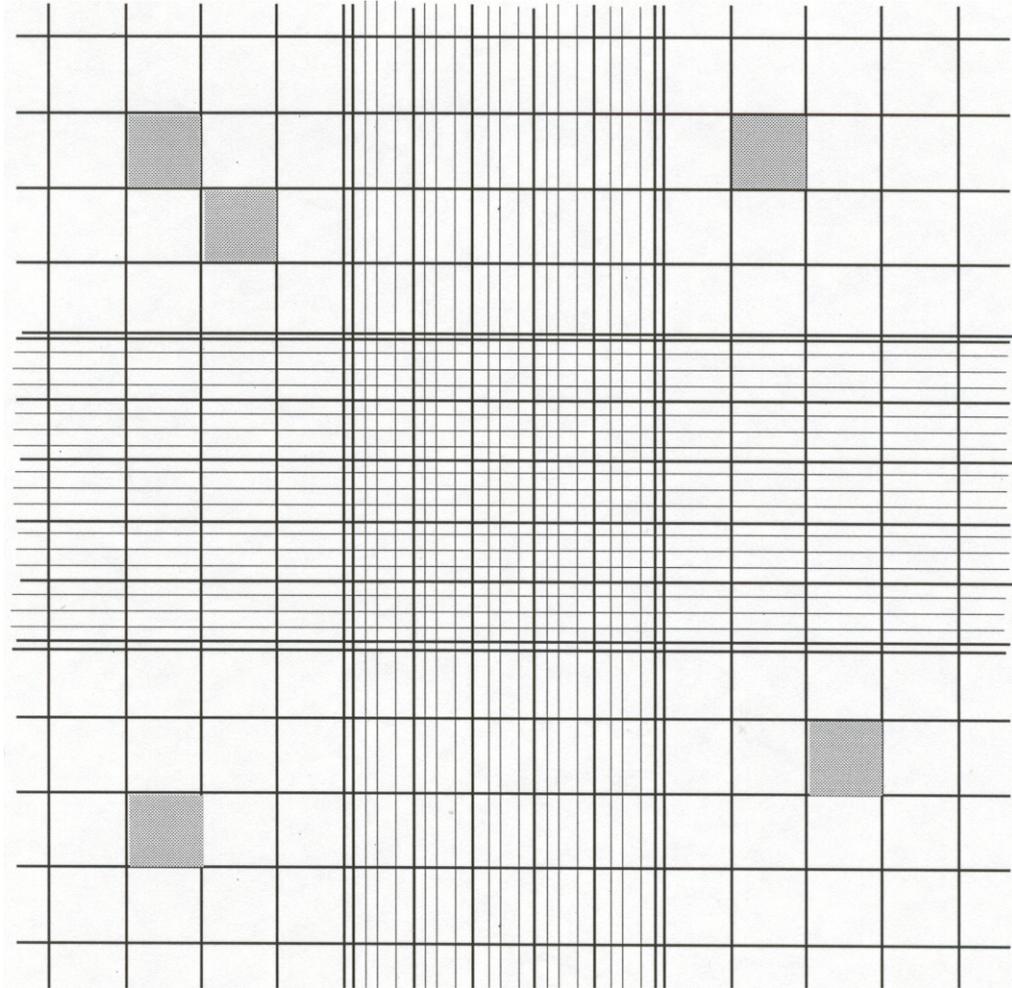


Diagrama. Cuadrícula de la Cámara de Neubauer.

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

- Adherir el cubreobjetos sobre la cámara humedeciendo sus bordes con 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 deberá estar templada y perfectamente seca, hasta la marca de 0.25.
- Limpiar el extremo de la pipeta cuidando de no variar el enrase.
- 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 una dilución de 5 microlitros de semen en 2 ml de agua.

Colocar la cámara bajo observación microscópica (100 o 200 aumentos). Si los espermatozoides no están repartidos uniformemente por toda la cámara, debe repetirse 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/ml se calcula multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrados por 12.800.000.

<p>Dilución 1:400</p> $\text{Esp/ml} = \frac{\text{Suma de esp.} \times 0.1 \text{ mm}^3 \times 10.000 \text{ ml/mm}^3 \times 400 \times 16}{5}$ <p>Esp/ml= Suma de esp. x 12.800.000</p>
---

## 2. Fotocolorímetro (espectro visible)

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) o la transmitida a través de la muestra (transmitancia). La concentración de la muestra será directamente proporcional a la absorbancia.

El colorímetro debe ser calibrado contra 10-15 conteos realizados en cámara de Neubauer de tal manera de obtener un gráfico de trabajo. Se utilizarán muestras de semen correspondientes a distintas concentraciones para su calibración fijando una dilución de semen (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 nm= 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

*Elaboración de diluyente para congelar semen de carnero*

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 heladera por 2 o 3 días, o congelada por un tiempo mayor, para evitar alteraciones. Es recomendable volver a medir el pH al momento de su utilización.

Se pesan el tris, la glucosa y el ácido cítrico en una probeta de 100 ml y se completa con 80 ml de 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= llevar 0.4 g de NaOH hasta 10 ml de solución, agregando agua destilada); si fuera alcalino se corrige con una solución de ácido cítrico (1M= llevar 1.9 g de ácido cítrico hasta 10 ml de solución, agregando agua destilada). Es conveniente agregar gota a gota los correctores de pH.

Es conveniente completar la preparación del diluyente el día de su utilización, agregando la yema de huevo a la solución madre entibiada previamente en baño de agua 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 terminarse de separar 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 se homogeneiza la solución invirtiendo la probeta tapada con papel de aluminio, varias veces.

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 agregará a la solución B previamente entibiada para lograr una buena homogeneización.

La solución B se colocará 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.

### **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, esterilizada, seca y templada, siempre volcando el diluyente por las paredes del tubo que contienen el semen y homogeneizando suavemente.

Conocida la concentración por ml, se procederá a determinar el volumen de solución A a añadir, según el Protocolo de Procesamiento de Semen (ver hoja adjunta).

El número de espermatozoides/dosis recomendado para inseminación intrauterina es de alrededor de 40 millones de espermatozoides. Los volúmenes de inseminación varían entre 0.1 y 0.3 ml; las pajuelas francesas tienen un volumen de 0.25 ml.

Se procede al agregado del diluyente, teniendo en cuenta las recomendaciones anteriores.

### **Descenso de temperatura-Tiempo de estabilización**

Agregado el total de diluyente A se inicia el descenso de temperatura, para lo cual se lleva el semen a heladera en un vaso con agua a 36 °C, acompañado de un termómetro de fácil lectura. El semen debe descender desde 36 °C a 5 °C en 30-35 minutos, a un ritmo de 2 °C cada 3 minutos aproximadamente. Este descenso se logra regulando previamente la heladera a 5 °C y con el agregado gradual de trocitos de hielo al baño de agua que acompaña al semen, en la parte final de la curva de enfriamiento.

A la fase de descenso de temperatura le sigue la de equilibramiento. En esta fase, 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 pipeta enfriada en la heladera, fraccionada en 3 partes iguales (1°, 2° y 3° glicerolización), a intervalos de 10 minutos, homogeneizando diluyente y semen luego de cada agregado.

### **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 a -79 °C). 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, pero más difíciles para identificar que las pajuelas.

### **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 un clavo previamente calentado a la llama. Convendrá hacer la operación de congelamiento en una habitación fría.

El semen se retirará de la heladera en un baño de agua a 5 °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 0.1-0.3 ml (3-8 gotas) por agujero, 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 1-2 minutos, 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.

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

## **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 colocadas 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. Se secan con papel absorbente, se crea una cámara 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 °C para que gelifique y selle el tapón recientemente formado.

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

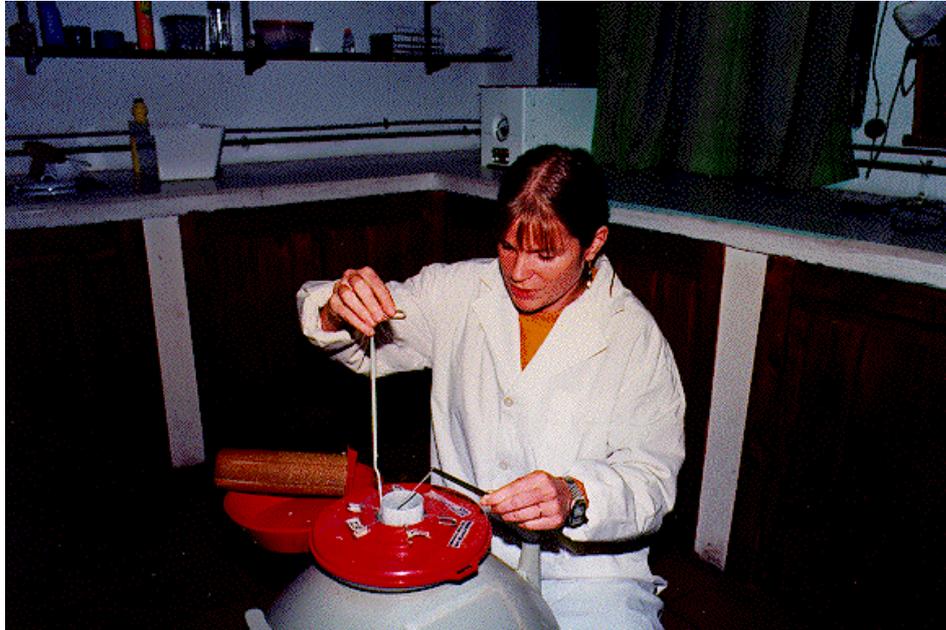
### **2. Congelamiento en vapores de nitrógeno líquido**

Será 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 20 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 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, se colocan en el marco de aluminio apoyando sólo sus extremos y cuidando de que no se toquen entre sí, ubicado con anterioridad en el interior de la caja en el 1º nivel. Se tapa la caja por 2 minutos. Seguidamente se la destapa y el marco con las pajuelas se ubica durante 3 minutos en el 2º nivel (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.

## 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 serán sumergidas en baño termostático a 36 °C, moviéndolas con una pinza durante 15 segundos bajo el agua.

Al momento de su utilización, 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, ya sea en un tubo de hemólisis previamente colocado en baño termostático o en la jeringa de inseminación.

### Examinación del semen post-descongelamiento

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

La examinación se lleva a cabo en un portaobjetos sobre platina térmica a 36 °C, inmediatamente después del descongelamiento, colocando una gota pura en portaobjetos templado para su observación al microscopio (100 aumentos). Se observará la motilidad masal al descongelamiento, repitiendo la observación 1 o 2 veces.

El resto del contenido de la pajuela o pastilla se diluir en 0.5 ml de Citrato de Sodio al 2.8% (2.8 g de Citrato de Sodio en 100 ml de agua destilada; pH: 6.7-6.9).

Una gota de semen diluido se observará entre porta y cubreobjetos templados. En esta observación es importante estimar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, 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).

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

- a) Motilidad masal al descongelamiento.
- b) Un porcentaje de vivos superior al 30% a los 5 minutos de incubación a 36 °C en baño termostático.
- c) Motilidad individual progresiva igual o superior a 2.5.

### **Descongelamiento del semen para su utilización**

Una vez descongelado el semen, se procederá al uso del mismo sin ningún tipo de dilución. El contenido de la pajuela podrá cargarse directamente en la jeringa de inseminación, o podrá vaciarse en un tubo de hemólisis colocado en el mismo baño de agua, para ser de luego cargado en la jeringa.

## **MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN CONGELADO**

El semen se guardará en portapajuelas identificados en la parte superior, dentro de los canastillos.

Durante su almacenamiento, es importante que el semen permanezca en nitrógeno líquido, ya que cualquier exposición a altas temperaturas irá en detrimento de su viabilidad. El nivel de nitrógeno dentro del termo debe ser verificado regularmente (semanal o quincenalmente), teniendo en cuenta que el mismo no debe descender por debajo de los 10 cm. Los traslados de un termo a otro deben hacerse con cuidado. Cuando se manipula el semen dentro del termo, es importante no elevar los canastillos más allá de la altura de la boca del termo.

Es conveniente almacenar los portapajuelas con tapón de algodón perfectamente seco.

## **CONSERVACION DEL SEMEN FRESCO, ENFRIADO Y REFRIGERADO**

*Semen fresco*: el semen que va a emplearse 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 6-12 horas a 15 °C.

*Semen refrigerado*: podrá conservarse por el transcurso de 24 horas a 5 °C.

En estos 2 últimos casos, es necesario proceder a su dilución.

### **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 leche descremada

Se utilizará leche descremada en polvo al 10%, más glucosa al 1%, en agua destilada. Por ej. 50 ml de agua destilada 5 g de leche descremada, 0.5 g de glucosa. El diluyente se mantendrá a 92-94 °C en baño de agua preferentemente tapado con papel de aluminio, 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, se añadirá 0.1 g de Estreptomicina 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 obtenido y debidamente analizado al microscopio, se realizará en forma aproximada, asegurándose una cantidad de 100 a 200 millones de espermatozoides por dosis (valores para inseminación cervical con semen fresco y enfriado/refrigerado, respectivamente). Por ej. si se tiene un volumen de 1 ml, con una concentración de 3000 millones de espermatozoides/ml para inseminar 30 hembras, con semen fresco, utilizando 0.1 ml de dosis de inseminación por animal, se requiere 3 ml de semen diluido. De tal manera que si se le agrega al semen 2 ml de diluyente se completan las 30 dosis.

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

### Semen fresco diluido

La temperatura del baño termostático se mantendrá a 28-30 °C. Se recomienda evitar que pase más de una hora desde la extracción del semen hasta la última inseminación.

La observación del semen al microscopio durante el transcurso de la inseminación permitirá ir verificando que el mismo conserve su motilidad.

### Semen enfriado y refrigerado

Luego de realizar la dilución del semen, el mismo se lleva a temperatura de 15 o 5 °C, 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 6-12 horas (semen enfriado) o 24 horas (semen refrigerado).