

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO CON SEMEN OVINO REFRIGERADO

### TIMED ARTIFICIAL INSEMINATION WITH RAM CHILLED SEMEN

Naim, P.<sup>1\*</sup>, M. Cueto<sup>1</sup> y A. Gibbons<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Bariloche. CC277 (8400) Bariloche. Argentina. \*naim@cab.cnea.gov.ar

#### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Concentración del semen.

#### ADDITIONAL KEYWORDS

Semen concentration.

#### RESUMEN

Se evaluó la preñez resultante de la inseminación artificial sistemática cervical (IASC) con semen ovino refrigerado a 5°C durante 12 o 24 h y dosis de 150 o 300 millones de espermatozoides. Doscientas ovejas adultas Merino se dividieron al azar en grupos de 40 animales, según arreglo factorial de los tratamientos (2x2) más un grupo control. En la estación reproductiva, los estros fueron sincronizados mediante 14 días con esponjas intravaginales con 60 mg acetato de medroxiprogesterona y 200 UI de eCG al retirar las esponjas. A las 12 y 24 h previas a la IASC se colectaron, diluyeron y refrigeraron los eyaculados. La dilución del semen se realizó con *OviPro* (Minitüb®, Alemania) en una relación 1:2 (semen/diluyente). El grupo control fue inseminado con semen fresco sin diluir y dosis de 100 millones de espermatozoides. La IASC se realizó en el orificio uterino externo a las 54-56 h después del tratamiento progestacional. La preservación seminal durante 12 h alcanzó el 25% (10/40) y 38% (15/39) de preñez con dosis de 150 y 300 millones de espermatozoides. El semen preservado durante 24 h determinó el 3% (1/37) y 19% (7/37) de preñez con dosis inseminantes de 150 y 300 millones de espermatozoides, respectivamente. El porcentaje de preñez del grupo control (59%) evidenció que las condiciones de la majada no estuvieron afectadas por el estado nutricional o de manejo. La IASC con semen refrigerado ovino durante 12 h y una dosis de inseminación de 300 millones de espermatozoides, permitió obtener una preñez aceptable (38%) considerando el beneficio de poder transportar semen a largas distancias y su bajo costo operativo.

#### SUMMARY

We evaluated pregnancy by timed artificial insemination (TAI) with ram semen chilled at 5°C during 12 or 24 h and insemination doses of 150 or 300 millions spermatozoa. Two hundred adult Merino sheep were randomly divided in 4 groups of 40 animals each, according to a factorial arrangement (2x2) plus a control group. During the breeding season, estrus were synchronized with intravaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate inserted for 14 days and administration of 200 UI PMSG at sponge removal. Twelve and 24 h before insemination, semen from adult Merino rams was collected, and after the ejaculates were diluted and chilled. Semen was diluted with the *Ovipro* extender (Minitüb®, Alemania) using a dilution rate of 1:2 (semen/extender). Control group was inseminated with fresh semen without diluent and an insemination dose of 100 millions spermatozoa. For every group, cervical TAI was performed 54-56 hours after progestational treatment. Preserved semen during 12 hours obtained 25% and 38% pregnancy with an insemination dose of 150 and 300 millions spermatozoa. Semen preserved for 24 hours caused 3% and 19% pregnancy with an insemination dose of 150 and 300 millions spermatozoa respectively. Control group showed a pregnancy of 59%, which evidenced that flock fertility was not affected by nutritional status or management. TAI with ram chilled semen during 12 h, with an insemination dose of 300 millions spermatozoa, was found to provide an acceptable fertility (38%), considering the benefit of carrying semen for long distances and the low operative cost for its implementation.

Recibido: 22-6-07. Aceptado: 24-7-08.

Arch. Zootec. 58 (223): 435-440. 2009.

## NAIM, CUETO Y GIBBONS

## INTRODUCCIÓN

Las tecnologías disponibles para favorecer el desarrollo de un programa de mejora genética tienen por base a la inseminación artificial (IA) (Fernández-Abella *et al.*, 2003), la que sin duda tiene relación directa con el desarrollo de las técnicas de preservación del semen (Maxwell y Salamon, 1993; Gil y Olivera, 2005; Evans y Maxwell, 1987).

La preservación de semen favorece un uso más eficiente y prolongado de los carneros asignados a programas de mejoramiento genético, al permitir su utilización durante y fuera de la estación reproductiva (Colas, 1975, 1984; Gibbons *et al.*, 1993; Gibbons y Cueto, 2004). Los carneros involucrados en estos programas se ven sometidos a períodos de intensa actividad, tolerando movimientos entre predios que conllevan a condiciones de estrés (transporte, cambios de ambiente y de alimentación, etc.), riesgo físico y sanitario, que en muchas ocasiones afectan la calidad seminal (Olivera *et al.*, 2005).

Las tecnologías disponibles, para evitar el traslado de reproductores entre establecimientos, se basan en la preservación del semen por largos períodos (semen congelado) o períodos breves (semen refrigerado y enfriado). Esta última tecnología se justifica debido a la practicidad implícita en su implementación (Paulenz *et al.*, 2003) y a su bajo costo, considerando a su vez que 20-40% de los sementales responde pobremente al congelamiento seminal (Vidament *et al.*, 1997). En la actualidad se considera que la preservación de semen ovino a 15°C (semen enfriado) resultaría adecuada para períodos breves de conservación (6-12 h), en comparación con la preservación a 5°C (semen refrigerado), que se adaptaría mejor para lapsos de tiempo más prolongados (12-24 h) (Fernández Abella, 2003). Sin embargo, ambos métodos de conservación seminal requieren de un aumento considerable de la concentración espermática por dosis inseminante respecto al

semen fresco (Salamon y Maxwell, 2000).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de preñez en la inseminación artificial del semen refrigerado de carnero, utilizando dos tiempos de preservación (12 o 24 h) y dos dosis inseminantes (150 o 300 millones de espermatozoides).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo durante el otoño del año 2006, en el Campo Anexo Pilcaniyeu del INTA Bariloche, provincia de Río Negro (70° 29' 30" longitud Oeste y 41° latitud Sur), ubicado en el área ecológica de Sierras y Mesetas Occidentales (Soriano, 1954), a 90 kilómetros al Este de Bariloche, Ruta Provincial 23.

Un total de 200 ovejas adultas de la raza Merino, fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP®, Syntex, Argentina), las cuales permanecieron colocadas durante 14 días. Al finalizar el tratamiento progestacional se aplicó una dosis de 200 UI de eCG por hembra (Novormon 5000®, Syntex, Argentina). Las ovejas se dividieron al azar en grupos de 40 animales cada uno, según arreglo factorial de los tratamientos (2x2) más un grupo Control (n= 40).

Las extracciones seminales se realizaron de 3 machos Merino adultos. La obtención del semen se realizó mediante la utilización de una vagina artificial. Los eyaculados se colectaron 12 y 24 h previas a la inseminación. Se mantuvieron en un baño termostático a 30°C durante la evaluación de la calidad seminal, siendo admitidos para su procesamiento aquellos que presentaron los siguientes valores: motilidad masal  $\geq 4$  en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo, observación microscópica a 100x), volumen seminal  $\geq 0,8$  ml y concentración espermática  $\geq 2500$  millones de espermatozoides/ml. La concentración espermática de cada eyaculado se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO CON SEMEN OVINO REFRIGERADO

Los eyaculados aceptados fueron rápidamente diluidos con una relación 1:2 (semen/diluyente). Se empleó el diluyente *OviPro*, facilitado por la empresa Biotay-Minitüb de Alemania para su utilización en la refrigeración de semen ovino. El diluyente se preparó según especificaciones del laboratorio con la relación de volumen 1:7:2 (*OviPro*: agua bidestilada apirógena: yema de huevo de gallina), obteniendo un pH final de 6,9.

Se obtuvieron dos eyaculados de cada carnero y para cada tiempo de preservación, luego fueron envasados independientemente en jeringas de 10 ml y selladas con alcohol polivinílico. La temperatura seminal fue disminuida a 5°C a partir de 30°C de forma gradual en 2 h. Una vez alcanzada la temperatura de refrigeración, las jeringas fueron colocadas en un conservador térmico con refrigerante durante los tiempos preestablecidos para cada grupo.

Para minimizar el efecto de la capacidad fecundante intrínseca de cada macho, antes de la IASC se conformaron 2 muestras conjuntas (pool) de 3 eyaculados distintos cada una, para cada tiempo de preservación. Las concentraciones espermáticas estimadas de las muestras conjuntas (pool) presentaron una concentración final de 992 y 1012 millones de espermatozoides/ml para la preservación seminal por 12 h, y 1225 y 1285 millones para la preservación del semen por 24 h. De esta forma, se descargó el volumen seminal con una pistola de inseminación multidosis precalibrada con volúmenes utilizados de 0,15; 0,30; 0,12 y 0,25 ml/oveja, respectivamente.

El grupo control fue inseminado con semen fresco (sin diluir) de 3 carneros, con un volumen de inseminación de 0,04 ml/oveja y una dosis de 100 millones de espermatozoides totales.

En la totalidad de los grupos, la inseminación artificial se realizó en el orificio uterino externo y en forma sistemática (sin detección de celo) a las 54-56 h posretiro de las esponjas y aplicación de eCG.

Para homogeneizar los tratamientos en la IASC, cada grupo de ovejas correspondiente a los tiempos de preservación seminal de 12 y 24 h se subdividió a la mitad, y a estos subgrupos se los intercaló con la tercera parte de las ovejas del grupo control. Asimismo la inseminación se realizó alternando las dosis inseminantes de 150 y 300 millones de espermatozoides.

A los 33 días de la IASC, se evaluó preñez en cada grupo (ovejas gestantes/ovejas inseminadas) por medio de ecografías transrectales (Aloka 500, 5 MHz, Japón).

El análisis de los datos se realizó mediante el procedimiento CATMOD del programa estadístico SAS (1990). Los resultados de los diferentes grupos de tratamiento fueron comparados por el test de  $\chi^2$  con un nivel de significación del 5%.

## RESULTADOS

La IASC fue realizada en 187 ovejas. Las restantes no fueron inseminadas, por no presentar signos vaginales de celo al momento de la inseminación (flujo mucoso, edema, hiperemia).

Al analizar la interacción entre los factores de los grupos de tratamiento (tiempo de preservación seminal; concentración espermática) no se registró significación estadística ( $p > 0,05$ ).

Los porcentajes de preñez presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de preservación seminal (12 vs. 24 h) y la dosis de inseminación (150 vs. 300 millones de espermatozoides totales). Los resultados indican un mayor porcentaje de preñez en la IASC con el semen refrigerado durante 12 h (32%, 25/79) respecto al semen preservado durante 24 h (11%, 8/74). A su vez, la eficiencia fue mayor con la dosis de inseminación de 300 millones de espermatozoides (29%, 22/76) en comparación con la dosis de 150 millones (14%, 11/77).

La preservación seminal durante 12 h

NAIM, CUETO Y GIBBONS

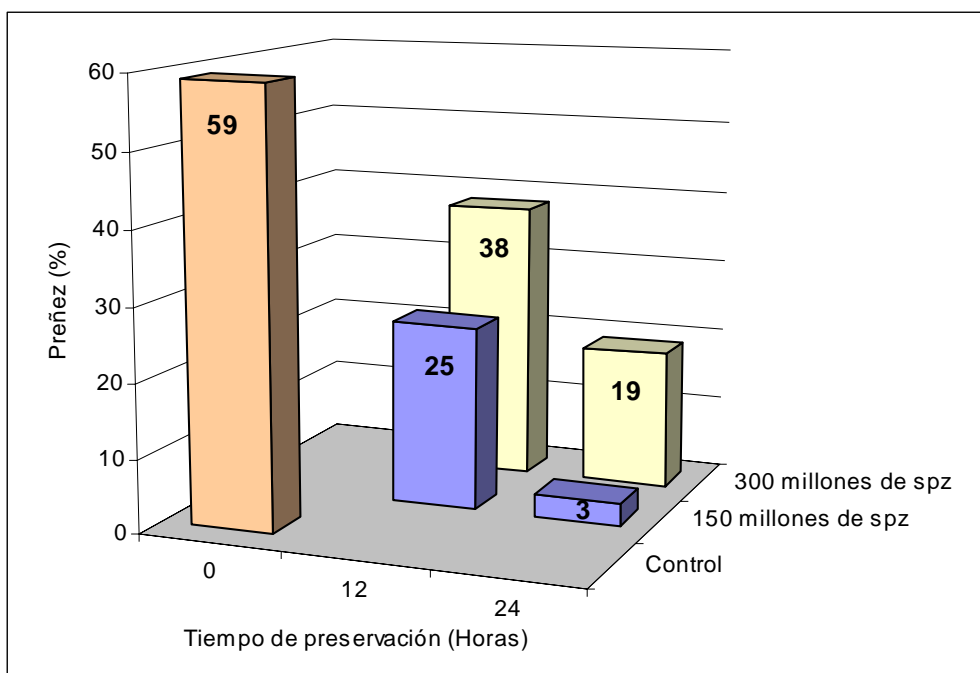
alcanzó el 25% (10/40) y 38% (15/39) de preñez con la dosis de inseminación de 150 y 300 millones de espermatozoides. El semen preservado por 24 h presentó el 3% (1/37) y 19% (7/37) de preñez con las dosis inseminantes de 150 y 300 millones de espermatozoides, respectivamente. El grupo control evidenció una preñez del 59% (20/34), valor de referencia de las condiciones generales de trabajo de la majada de experimentación (**figura 1**).

DISCUSIÓN

En nuestra experiencia, la eficiencia de preñez registrada en el grupo control (59%) se encuentra dentro del rango de referencia

(58-65%) que el grupo de Reproducción de Pequeños Rumiantes del INTA EEA Bariloche ha obtenido en los últimos años, con la implementación de la IASC con semen fresco en la raza Merino (Cueto y Gibbons, 2005). De esta forma se evidenció que las condiciones generales de preñez de la majada no estuvieron afectadas por el estado nutricional o de manejo.

En este trabajo se verificó un mayor porcentaje de preñez, independientemente de la concentración espermática, cuando se utilizó el menor tiempo de preservación seminal, evidenciando el efecto negativo de un prolongado período de conservación. Asimismo se determinó un incremento en la eficiencia de la IASC al aumentar al doble la



**Figura 1.** Preñez obtenida en la IASC con semen refrigerado durante 12 y 24 h y dosis de inseminación de 150 y 300 millones de espermatozoides (spz). El grupo control fue inseminado con semen fresco y una dosis de 100 millones de espermatozoides. (Pregnancy by cervical TAI with chilled semen during 12 and 24 h and insemination doses of 150 and 300 millions of spermatozoa. Control group was inseminated with fresh semen and an insemination dose of 100 millions of spermatozoa).

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO CON SEMEN OVINO REFRIGERADO

dosis de inseminación, independientemente del tiempo de preservación, sugiriendo que se presenta una incidencia del número de espermatozoides inseminados sobre la preñez y que se debería realizar un ensayo de determinación de la dosis mínima de inseminación en la IASC.

Al analizar el efecto de la dosis de inseminación sobre la eficiencia de preñez en la IASC con semen refrigerado durante el período de preservación de 12 h, se observó que, mediante el empleo de la dosis seminal de 300 millones de espermatozoides, fue posible obtener una preñez aceptable (38%), al considerar el beneficio de poder transportar semen a largas distancias y el bajo costo operativo para su implementación. Sin embargo, al reducir la dosis de inseminación a 150 millones de espermatozoides, se logró una menor eficiencia de preñez del 25%, la cual constituye un valor superior al 10,6% referenciado en la experiencia de Menchaca *et al.* (2005). La diferencia de preñez observada podría deberse a una mejor conservación de la capacidad fecundante del semen diluido en el diluyente comercial utilizado en esta experiencia en comparación con el diluyente en base a TRIS empleado por estos últimos autores.

Los valores obtenidos mediante la preservación seminal durante 24 h, se evidencian las tasas más bajas de preñez, en especial referencia a la dosis de inseminación de 150 millones de espermatozoides. Es importante señalar que la bibliografía disponible en ovinos para tiempos de preservación mayores de 12 h, evidencia bajos porcentajes de preñez similares a los obtenidos aquí

(Colas, 1984; Menchaca *et al.*, 2005).

Si bien mediante la IASC se evita la detección de celos, el manejo de machos marcadores de celo y se reduce el tiempo de trabajo, cabe destacar que existe una disminución en la preñez de los celos inducidos respecto a los celos naturales (Colas, 1984; Fernández Abella, 1995), asociada a una inhibición del transporte espermático en el tracto reproductivo (Hawk *et al.*, 1981) que, para las condiciones de campo locales, se encuentra establecida en 10-15%. En relación a esta información, los resultados obtenidos con IASC (semen refrigerado durante 12 h y una dosis inseminante de 300 millones de espermatozoides) evidencian un porcentaje de preñez cercana al 40%, en tanto que en la bibliografía, mediante la IA con detección de celos naturales, se observan valores de preñez entre el 40 al 60% (Paulenz *et al.*, 2003; Menchaca *et al.*, 2005).

Futuras investigaciones deberán realizarse a fin de incrementar la eficiencia reproductiva de la refrigeración seminal en asociación con la IASC, debido a las múltiples ventajas de su utilización por los diferentes sistemas de producción ovina.

En conclusión, el semen refrigerado diluido con *OviPro* durante 12 h, para su posterior utilización en la IA sistemática (54-56 h postratamiento progestacional y gonadotrófico) con la dosis de inseminación de 300 millones de espermatozoides, permitió alcanzar una preñez del 38%, siendo este valor considerado como aceptable por el beneficio que brindaría el semen refrigerado en los programas de mejoramiento genético.

## BIBLIOGRAFÍA

- Colas, G. 1975. The use of progestagen SC9880 as an aid for artificial insemination in ewes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15: 317-327.
- Colas, G. 1984. Semen technology in the ram. In: *The male in farm animal reproduction*. Courot, M. (ed.). Martinus Nijhoff. New York. p. 219-234.
- Cueto, M. y A. Gibbons. 2005. Evaluación de la inseminación artificial en ovinos. Memorias del VII Curso de Actualización en Producción Ovina. Ediciones INTA. Argentina. 244 p.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamon's artificial insemination in sheep and goats*. Butterworth Pty Ltd. Sydney. 189 p.
- Fernández-Abella, D.H. 1995. Temas de repro-

NAIM, CUETO Y GIBBONS

- ducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Estación Experimental de Salto. Montevideo. Uruguay. 206 p.
- Fernández-Abella, D.H., M.O. Preve and N. Villegas. 2003. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*, 60: 21-26.
- Gibbons, A. y M. Cueto. 2004. Jornadas de inseminación artificial con semen fresco en ovinos. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA. Bariloche. N° 200.
- Gibbons, A., M. Cueto, M. Wolff, J. Arrigo y J.C. García Vinent. 1993. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche N° 443.
- Gil, J. y J. Olivera. 2005. Preservación de semen de carnero a 5°C: resultados con diferentes diluyentes para la IA en majadas del Proyecto Merino Fino. Serie de Actividades de Difusión 392. INIA Tacuarembó. Avances obtenidos en el Proyecto Merino Fino del Uruguay: Núcleo Fundacional U.E. Glencoe 1999-2004.
- Hawk, H., B. Cooper and V. Pursel. 1981. Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J. Anim. Sci.*, 52: 601-610.
- Maxwell, W.M.C. and S. Salamon. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fert. Develop.*, 5: 613-638.
- Menchaca, A., A. Pinczak and D. Queirolo. 2005. Storage of ram semen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim. Reprod.*, 2: 195-198.
- Olivera, J., A. Gil, J. Gamarra, V. Teixeira y S. Fierro. 2005. I-Preservación seminal para la IA cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: semen refrigerado (24 y 48 h). Programa de apoyo y vinculación con sector productivo.
- Paulenz, H., S. Lennart, Å. Tormod, H.F. Ove and A.B. Kjell. 2003. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology*, 60: 759-766.
- Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111.
- SAS. 1990. SAS User's Guide: Statistics. Version 6. Fourth Edition. Statistical Analysis System Institute. Cary, NC.
- Soriano, A. 1954. Los distritos florísticos de la provincia patagónica. *Rev. Invest. Agric.*, 10: 323-367.
- Vidament, M., A.M. Dupere, P. Julienne, A. Evain, P. Noue and E. Palmer. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48: 907-917.