ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 306-308

INSEMINACIÓN CERVICAL EN OVINO CON SEMEN CONSERVADO 24 HORAS A 5ºC Y ANÁLISIS POR DISTRIBUCIÓN EN CONTRACORRIENTE

J.I. Martí[1], E. Martí[2], E. Echegoyen[1], J.A. Cebrián-Pérez[2], T. Muiño-Blanco[2], J. Folch[1] y J.L. Alabart[1]

[1]Servicio de Investigación Agroalimentaria. Aptdo. 727, 50080 Zaragoza.
[2]Dpto de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La aplicación de semen ovino congelado no ha permitido obtener unos altos valores de fertilidad, salvo cuando se utiliza en la inseminación artificial (IA) la vía intrauterina (Maxwell y Watson, 1996; Bari y cols. 2001). Las barreras del cuello uterino y del transporte espermático del semen conservado son limitantes que impiden obtener buenos resultados de fertilidad. Por ello, en Europa se usa mayoritariamente semen refrigerado a 15ºC por vía cervical. Los resultados de fertilidad de semen conservado en refrigeración son variables, obteniéndose mejor calidad *in vitro* y mejor conservación utilizando diluyentes a base de yema de huevo (Maxwell y Salamon, 1993), siendo importante la leche descremada para mantener una buena movilidad espermática y fertilidad.

Una de las limitaciones del semen mantenido a 15ºC es la rápida pérdida de su poder fecundante, lo que dificulta su uso en explotaciones alejadas de los centros de selección e inseminación. El empleo de semen conservado a 5ºC facilitaría su transporte a explotaciones alejadas del punto de obtención si se mantiene su capacidad fecundante (Fernández-Abella y cols., 2003), con un menor coste que el derivado de la utilización de semen congelado. Por ello se decidió poner a punto un medio para abordar la inseminación con este tipo de muestras, evaluando paralelamente dichas muestras mediante distribución en contracorriente (CCCD), por ser una técnica que permite predecir la capacidad fecundante de una muestra seminal (Pérez-Pé y cols., 2002).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha empleado semen ovino de moruecos de 2 a 4 años de edad de la raza *Rasa Aragonesa*, obteniendo dos eyaculados por morueco que posteriormente se mezclaron para eliminar el efecto individual. Se llevaron a cabo dos experimentos, en primavera (Experimento 1) y verano (Experimento 2), con el fin de evaluar los efectos de la conservación del semen refrigerado a 5 ºC durante 24 horas sobre la fertilidad, comparado con el semen refrigerado a 15ºC aplicado el día de la obtención. En el Experimento 1, el semen se diluyó en un medio de leche con galactosa y un porcentaje de yema del 7%, conservando una alicuota a 5ºC durante 24 horas, mientras que la otra se empajueló y transportó a 15ºC al lugar de inseminación. En el Experimento 2, se aumentó el porcentaje de yema de huevo al 14%. El diluyente utilizado para conservación del semen fue una modificación del utilizado por Söderquist y cols. (1997) en la congelación de espermatozoides ovinos, sustituyendo la fructosa por galactosa y eliminando el glicerol, siendo la composición: leche desnatada, galactosa 224 mM y antibióticos (2000 UI de penicilina y 0,4 mg de estreptomicina/ml).

La rampa de descenso de la temperatura hasta los 5ºC, para la muestra que se iba a conservar durante 24 horas, se realizó a una velocidad de 0,4ºC/min en un criocongelador. Una vez alcanzada dicha temperatura, la muestra se mantuvo en una nevera a 5ºC.

La motilidad individual progresiva se evaluó en microscopio de contraste de fases con una platina de 37ºC. La viabilidad espermática se determinó mediante la tinción con diacetato de carboxifluoresceína y ioduro de propidio (Harrison y Vickers, 1990).

Las ovejas eran de raza Rasa Aragonesa, adultas, con un intervalo al parto anterior superior a 3 meses y una condición corporal media de 3.3 (según escala 1-5; Russel y cols., 1969). El celo de las ovejas se sincronizó con esponjas intravaginales (40 mg de acetato de

fluorogestona), durante 12 días, y 480 UI de eCG en el momento de la retirada. Se utilizaron lotes de 50 ovejas con cada uno de los medios de dilución, siendo inseminadas todas ellas a las 55 horas de la retirada de la esponja con una dosis de 0,5 ml con una concentración de 800 millones de espermatozoides/ml.

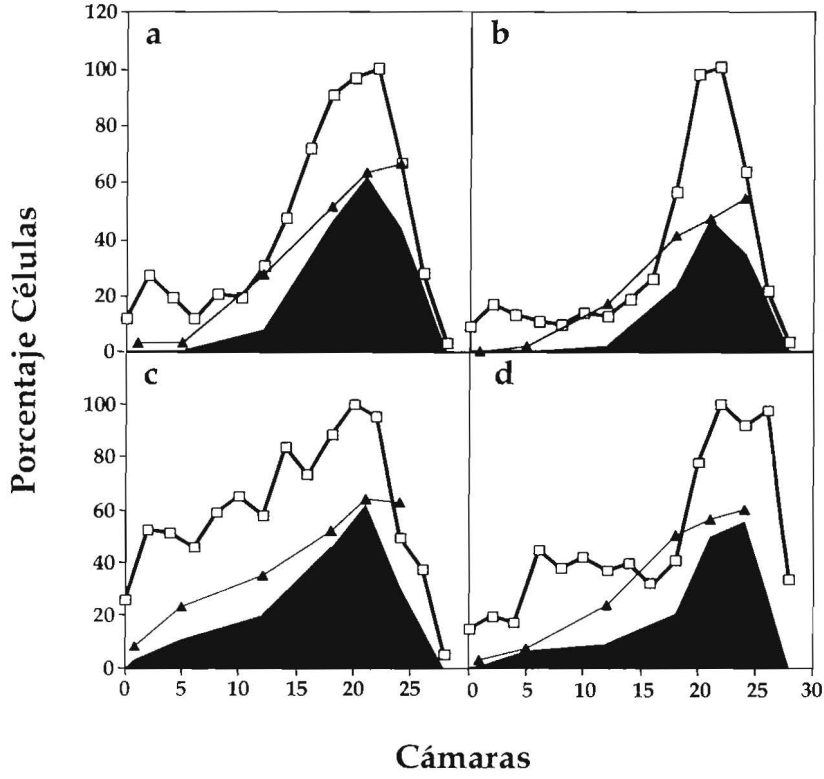
Las mismas muestras con las que se realizó la inseminación artificial se analizaron mediante CCCD según el protocolo descrito por Pérez-Pé y cols. (2002), filtrando las muestras previamente a ser cargadas en las cámaras. A partir de los perfiles de distribución resultantes se obtuvieron los parámetros post-CCCD necesarios para calcular el porcentaje de fertilidad esperado con la muestra (FP) en la que $FP=6,02+0,069V_2+0,315H$, donde V_2 es el área de viabilidad en la zona central del perfil de CCCD (cámara 10-19) y H la heterogeneidad de la muestra, determinada como el porcentaje de cámaras que contenían un número de células mayor o igual al 50%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de motilidad y viabilidad de las muestras previamente al empajuelado fueron superiores al 60% para las cuatro muestras, no habiéndose observado diferencias significativas después de las 24 horas tras la recogida en ninguno de los parámetros.

La Fig. 1 muestra los perfiles de distribución de las cuatro muestras utilizadas en las inseminaciones, a partir de los cuales se obtuvieron los valores de heterogeneidad y viabilidad para predecir la fertilidad que se iba a obtener con dichas muestras.

Fig. 1. Perfiles de CCCD de las muestras diluidas en medio con 7 % de yema de huevo de semen refrigerado a 15ºC (a) y refrigerado a 5ºC (b), y en medio con 14% yema de huevo de semen refrigerado a 15ºC (c) y refrigerado a 5ºC (d). Porcentaje de células en cada cámara respecto al máximo (-□-); porcentaje de células viables en cada cámara (-▲-); distribución de las células viables totales (■).



En el Experimento 1, los valores de FP fueron de 29,97% y 20,67% (Tabla 1), próximos a los obtenidos tras los partos, 34% y 24% respectivamente, valores muy bajos para inseminación cervical para ambas muestras. Como el uso de yema de huevo es fundamental para poder mantener el semen a 4-5ºC (Fernández-Abella y cols., 1998), en el Experimento 2 se incrementó el porcentaje de yema de huevo en el diluyente hasta el 14%. Esto se reflejó en un aumento de los valores de FP, de 53,38% para la muestra de semen refrigerado a 15ºC y 26,91% para la conservada 24 horas. De nuevo, estos valores fueron similares a los de fertilidad al parto, siendo del 57% y 29% respectivamente, porcentaje aceptable para la muestra de fresco en época estival pero muy bajo todavía para la conservada 24 horas.

Los resultados obtenidos a 15ºC con 14% de yema de huevo no son distintos a los obtenidos en las explotaciones privadas con leche desnatada (Fantova y cols., 2000). Estos resultados ratifican la utilidad de la CCCD para la predicción de la capacidad fecundante de un eyaculado y aconsejan una modificación en el diluyente para la conservación durante 24 horas.

Tabla 1. Porcentaje de FP de las muestras de semen refrigerado a 15ºC y a 5ºC con distinto porcentaje de yema de huevo en el medio

Experimento	% yema	Semen refrigerado a 15ºC	Semen refrigerado a 5ºC
1	7	29,27	20,67
2	14	53,38	26,91

Tabla 2. Porcentaje de fertilidad al parto e índice de prolificidad de las muestras de semen refrigerado a 15ºC y a 5ºC con distinto porcentaje de yema de huevo en el medio

Experimento	% yema	Número de ovejas	Semen refrigerado a 15ºC		Semen refrigerado a 5ºC	
			Fertilidad (%)	Prolificidad	Fertilidad (%)	Prolificidad
1	7	50	34	1,29	24	1,58
2	14	50	57	1,75	29	1,88

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray, A. y Merrell, B. (2001). *Theriogenology* **56,** 147-155.

Fantova, E., Ciudad, M.A., Vijil., E., Sevilla, E., Quintin, F., Folch, J., Alabart., J., Sin, E. y Equipo Veterinario de Carnes Oviaragón S.C.L. (2000). *SEOC* **XXV,** 611-613.

Fernandez-Abella, D., Villegas, N y Bellagamba, M. (1998). *Producción Ovina SUL* **11,** 51-62.

Fernandez-Abella, D., Preve, M. y Villegas, N. (2003). *Theriogenology* **60,** 21-26.

Harrison, R. y Vickers, S. (1990). *J Reprod Fert* **88,** 343-352.

Maxwell, W. y Salamon, S. (1993). *Reprod Fert Dev* **5,** 613-638.

Maxwell, W. y Watson, P. (1996). *Anim Reprod Sci* **42,** 55-65.

Pérez-Pé, R., Martí, J., Sevilla, E., Fernández-Sánchez, M., Fantova, E., Cebrián-Pérez, J. y Muíño-Blanco, T. (2002). *Reproduction* **123,** 869-875.

Russel, A., Doney, J. y Gunn, R.G. (1969). *J. Agr.Sci.* **72**: 451-454.

Söderquist, L., Madrid-Bury, N. y Rodriguez-Martinez, H. (1997). *Theriogenology* **48,** 1115-1125.

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto INIA SC00-051-C3-2 y CICYT AGL 2000-7221