

Efecto de dos diluyentes sobre la tasa de preñez por inseminación artificial laparoscópica en ovinos.

Cely, L.D.; Jaramillo, C.X.; Fonseca, M.J.

Grupo de Investigación en Ciencias Animales, Laboratorio de Reproducción Animal, Programa de Medicina Veterinaria, Cátedra de Reproducción Animal, Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Agrarias, Santander, Colombia. Email: xavier.jaramillo@unipamplona.edu.co

Resumen

Cely, L.D.; Jaramillo, C.X.; Fonseca, M.J.: Efecto de dos diluyentes sobre la tasa de preñez por inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Rev. Vet.* 32: 2, 221-224, 2021. El objetivo del estudio fue evaluar dos diluyentes comerciales para el congelamiento de semen ovino y determinar su efecto en la tasa de preñez al ser utilizados en inseminación artificial laparoscópica. El semen utilizado fue de un carnero Dorper adulto, cuyo eyaculado fue dividido en dos: una alícuota fue diluida con un diluyente comercial con base de lecitina de soya y la otra con un diluyente con base de yema de huevo. El semen fue criopreservado (100×10^6 espermatozoides móviles) y cada tipo de dilución fue utilizado para inseminar 15 ovejas. Las hembras fueron sincronizadas con esponjas intravaginales e inseminadas vía laparoscópica. El diagnóstico de preñez por ecografía se hizo a los 60 días del servicio. Los resultados indicaron una tasa de preñez de 85% con semen diluido en base de lecitina de soya y 78% con yema de huevo, no habiendo diferencias significativas entre tratamientos. Se concluye que la tasa de preñez obtenida con los dos diluyentes utilizados es similar, por lo cual ambos ofrecen los mismos beneficios a la hora de implementarlos en un programa reproductivo para la especie ovina, mediante inseminación artificial laparoscópica.

Palabras clave: criopreservación, espermatozoides, gestación, ovinos, ultrasonografía.

Abstract

Cely, L.D.; Jaramillo, C.X.; Fonseca, M.J.: Effect of two diluents on pregnancy rate by laparoscopic artificial insemination in sheeps. *Rev. Vet.* 32: 2, 221-224, 2021. The aim of this study was to evaluate two commercial diluents for the freezing of sheep semen and determine their effect on the pregnancy rate when used in artificial laparoscopic insemination. The semen used was from an adult Dorper ram, whose ejaculate was divided in two and one aliquot was diluted with a commercial diluent based on soy lecithin and the other aliquot with a commercial diluent based on egg yolk. The semen was cryopreserved (100×10^6 motile sperm) and each type of dilution was used to inseminate 15 sheep. The females were synchronized with intra-vaginal sponges and inseminated via laparoscopic. The diagnosis of pregnancy by ultrasound was made 60 days after the service. The results indicated a pregnancy rate of 85% with semen diluted with soy lecithin and 78% with egg yolk, with no significant differences between treatments. Conclusions: pregnancy rate obtained with the two diluents was similar; therefore these offer the same benefits to use in ovine reproductive programs, by laparoscopic artificial insemination.

Key words: cryopreservation, sperm, pregnancy, sheep, ultrasound.

INTRODUCCION

La inseminación artificial (IA) es una de las prácticas de manejo más valiosas para los productores de las especies ovinas en los programas de reproducción que emplean semen descongelado^{3, 17, 18, 22}.

El proceso de inseminación artificial en ovinos supone dos limitantes que revisten gran importancia dentro de esta área, uno de ellos está directamente relacionado con la anatomía tortuosa del cuello uterino, que no permite el paso adecuado o fácil de la zona para inseminar en la especie ovina, la cual a diferencia de

otras especies como la bovina, porcina y equina, no presentan dicho inconveniente.

Se han diseñado catéteres específicos adaptados a la luz tortuosa del cuello uterino de los ovinos, para tratar de atravesar esa "barrera cervical"^{2, 12, 14, 24}. Como alternativa, se emplea la técnica de inseminación laparoscópica para depositar el semen descongelado inmediatamente al interior de los cuernos¹³.

El otro inconveniente radica en la baja capacidad de fertilización de los espermatozoides, porque sufren alteraciones debidas al estrés oxidativo producido por el choque térmico²⁰. La anterior situación la expresan

estudios donde se argumenta que los espermatozoides de ovinos son más susceptibles que los espermatozoides de bovinos al procedimiento de congelación y descongelación, técnica que conlleva la reducción del número de células móviles²³.

Como ventajas de la IA se pueden enlistar que las tasas de preñez empleando semen descongelado son bastante buenas comparadas a la inseminación transcervical²⁰. Por otra parte es factible emplear dosis inseminantes con menor concentración de esperma. Para lo anterior se requiere de personal capacitado en la estrategia anestésica, conocimiento y manejo del equipo y desde luego la anatomía de la especie a trabajar¹³.

Actualmente algunos estudios describen nuevos métodos para el depósito intrauterino transcervical de semen, empleando para ello una incisión quirúrgica de los pliegues cervicales, técnica que se constituye en un procedimiento novedoso permitiendo tasas de preñez satisfactorias en toda la vida del paciente.

La IA es importante porque de su eficacia depende el progreso genético del hato y, asimismo, la eficiencia reproductiva. Sin embargo, la IA con semen congelado no es muy difundida en la especie ovina, debido principalmente a las bajas tasas de fertilidad que son obtenidas²².

Los espermatozoides de ovinos son más susceptibles que los espermatozoides bovinos al procedimiento de congelación y descongelación, técnica que conlleva la reducción del número de células móviles²³.

Los daños producidos en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación podrían ser parcialmente obviados usando diluyentes adecuados, tales como yema de huevo, pese a su limitante de ser un medio óptimo para bacterias y endotoxinas. No obstante, ha reportado tener un efecto tóxico en los espermatozoides de las especies bufalina, ovina y caprina¹. Así mismo, se indica que contiene trazas de hormonas y sus precursores, que podrían disminuir la capacidad de fertilización de los espermatozoides¹¹.

Los diluyentes libres de elementos de origen animal que contienen lecitina de soya tienen un efecto crioprotector por su baja viscosidad, poseen menos residuos y alto contenido de fosfolípidos, al igual que la yema de huevo⁹.

Se reporta que la lecitina de soya (1-2%) tiene la ventaja frente a los diluyentes convencionales (yema de huevo y leche) de ser un compuesto libre de patógenos, incluso cuando se hace el almacenamiento a baja temperatura de semen ovino; de allí que los diluyentes comerciales actuales contienen proteína vegetal (lecitina de soya) como protectores en la criopreservación^{6,10}.

A pesar de haberse empleado una gran cantidad de diluyentes para la congelación de semen ovino, no existe una metodología que proporcione datos sobre los mejores resultados para el semen descongelado²¹.

El objetivo de esta investigación fue evaluar dos diluyentes comerciales utilizados rutinariamente en la especie bovina para el congelamiento de semen ovino y determinar los resultados en términos de tasas de pre-

ñez al ser utilizados en inseminación artificial laparoscópica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos de evaluación, dilución y congelación del material seminal ovino fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal, perteneciente a la granja Villa Marina de la Universidad de Pamplona, Colombia.

Colecta y congelación de semen

Se seleccionó un ovino Dorper de 1,5 años y 60 kg de peso. El semen fue colectado mediante electroeyaculador *Electro Jac-5*. La calidad seminal fue evaluada tal como lo efectuaron acertadamente otros investigadores⁷, considerando las características macroscópicas (volumen, color, olor, aspecto) y las características microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, concentración, morfoanomalías y porcentaje de vivos y muertos) empleando un microscopio óptico (Scientific). El semen fue diluido utilizando dos diluyentes comerciales, uno con base a lecitina de soya (Andromed) y otro con base a yema de huevo (Tryladil). En ambos casos, el semen fue criopreservado mediante la congeladora de semen Cryogen que se observa en la *Figura 1*.

Sincronización de celos

Para los procesos de sincronización e inseminación artificial laparoscópica fueron seleccionadas 30 hembras de la raza *ovino de pelo colombiano* (OPC), con edad promedio de 20 meses y peso de 40 kg, ubicadas en el municipio de *Labateca Norte* (Santander, Colombia). Las ovejas fueron sincronizadas mediante esponja intravaginal (*Progespon*) impregnada con 60 mg de acetato de medroxi-progesterona. Las esponjas fueron mantenidas durante siete días para luego ser retiradas, aplicándose un análogo de *prostaglandina F2 alfa* a una dosis total de 0,2 mg (*Estrumate*) y 200 UI de *eCG-gonadotropina coriónica equina* (*Novormon*),



Figura 1. Congeladora de semen *Cryogen*[®] modelo *Neovet*.



Figura 2. Introducción de la cámara a través del trocar.



Figura 3. Exploración rectal ecográfica con ecógrafo *Sonoscape* para el diagnóstico de preñez.

vía intramuscular. La inseminación se llevó a cabo a las 52 horas de las aplicaciones de *prostaglandina* y *eCG*.

Inseminación artificial por laparoscopia

Para la pre-anestesia se utilizó *xilacina* al 2% a dosis de 0,05 mg/kg, vía intramuscular. Posteriormente, cada hembra fue posicionada en la camilla de cirugía, sujetando las cuatro extremidades y aplicando 5 ml de *lidocaina* al 2% (*Roxicaina*) por vía subcutánea alrededor del lugar de incisión. Para la *IA laparoscópica* se realizaron dos pequeñas incisiones de 5 cm craneales a la base de la glándula mamaria y 4 cm lateral a la línea alba. Luego fue introducida, por una de las incisiones, una *Aguja de Veress* conectada a la máquina insufladora de CO_2 (*L'care*) para introducir el gas en la cavidad abdominal. Una vez retirada la *Aguja de Veress* se colocaron *trócares* de 5 mm. Por una de las incisiones se introdujo la cámara y por la otra la *pinza Maryland* para ubicar los cuernos uterinos, cómo puede apreciarse en la *Figura 2*. Una vez identificados se retiró la pinza y se introdujo la *pipeta de Robertson (Minitube)* con el semen, depositando por punción 0,25 ml en cada cuerno uterino. Finalmente, se retiraron la cámara y la pipeta, se hizo presión en el abdomen para expulsar el CO_2 por los trocares, y el paciente fue llevado al área de recuperación y posicionado en decúbito lateral derecho, aplicándosele una crema cicatrizante (*Neobest*) en las incisiones y una dosis (5 mg/kg) de oxitetraciclina L.A. (*Erma*) vía intramuscular.

Descongelamiento del semen

Para la inseminación, las pajillas de semen fueron retiradas del termo de nitrógeno líquido (*Taylor Wharton*) y fueron depositadas en un termo descongelador por 50 segundos a 37°C. El semen descongelado fue vertido en un tubo *Eppendorf* de 2 ml. Se evaluó la motilidad progresiva al microscopio óptico para determi-

nar la viabilidad del semen, y posteriormente se cargó el semen en la *pipeta de Robertson* para realizar la *IA*.

Tasa de preñez

El diagnóstico de gestación por ecografía se realizó a los 60 días de la *IA*. Se utilizó un ecógrafo (*Sonoscape*) con transductor rectal cubierto por una manga de palpación, como se observa en la *Figura 3*.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados aplicando la prueba de *Chi cuadrado* (χ^2) y los correspondientes coeficientes de asociación. Todos los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de preñez utilizando como diluyente del semen a la lecitina de soya (*Andromed*) fue de 85% (12/15), mientras que la tasa de preñez utilizando como diluyente a la yema de huevo (*Triladyl*) fue de 78% (11-15), no habiendo diferencia estadística significativa entre los tratamientos. Los resultados de la prueba *Chi-cuadrado* indicaron que las variables fueron independientes ($p=0,6217$), es decir, que la preñez fue independiente del diluyente utilizado.

Tales hallazgos concuerdan con lo reportado en otro estudio en el cual se obtuvo tasa de preñez del 85% utilizando lecitina de soya y del 78% con yema de huevo⁹. Asimismo, los resultados concuerdan con otra publicación en la que se reportó 42% de preñez para yema de huevo y 44% para lecitina de soya¹⁵. Diversos estudios han reportado porcentajes de preñez entre 45 y 80%, obtenidos por *IA* artificial laparoscópica^{3, 4, 8, 19}.

El 78% de preñez obtenido en este estudio con el diluyente a base de yema de huevo, corrobora la afir-

mación de que el uso de este diluyente ofrece mejor motilidad y mayor fertilidad con semen congelado/descongelado⁶.

No obstante, en otro estudio se reportó una tasa de preñez de 64,7%¹⁶, pudiendo deberse esta diferencia a que en dicho estudio se utilizó una concentración de 40 x 10⁶ espermatozoides móviles, mientras que en el presente estudio se trabajó con 100 x 10⁶ espermatozoides móviles. Las altas tasas de preñez obtenidas en este estudio podrían deberse al uso de esponjas impregnadas con progesterona, ya que éstas favorecen el desarrollo y fertilización del ovocito⁵.

No obstante, el objetivo de este estudio fue determinar si existen diferencias en cuanto a las tasas de preñez entre los dos diluyentes evaluados, lo cual fue confirmado al no existir diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de preñez obtenidas con ambos.

CONCLUSIÓN

La tasa de preñez obtenida con los dos diluyentes utilizados fue similar, por lo tanto ambos ofrecen los mismos beneficios a la hora de implementarlos en un programa reproductivo para la especie ovina, mediante inseminación artificial laparoscópica.

REFERENCIAS

1. **Aboagla EM, Terada T.** 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryo-preservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160-1172.
2. **Álvarez M et al.** 2012. Design and *in vivo* evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. *Anim Reprod Sci* 131: 3-4, 153-159.
3. **Anel L et al.** 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* 63: 4, 1235-1247.
4. **Avendaño RL et al.** 2007. Reproduction performance of Pelibuey ewes in response to estrus synchronization and artificial insemination in northwestern Mexico. *J Anim Vet Adv* 6: 807-812.
5. **Bari F et al.** 2001. The repeatability of super-ovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology* 56: 147-155.
6. **Cámara DR, Guerra MM.** 2011. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influencia da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Rev Bras Reprod Anim* 5: 33-40.
7. **Evans G, Maxwell WM.** 1990. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*, Editorial Acriba, Zaragoza, pag. 204.
8. **Flores JP et al.** 2017. Evaluación de la utilización de semen congelado y refrigerado en la inseminación artificial por laparoscopia en la especie ovina. *AICA* 9: 41-47.
9. **Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K.** 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J Reprod Develop* 54: 286-289.
10. **Hernández L et al.** 2014. Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soya sobre parámetros morfométricos en semen caprino. *SENNOVA (Sistema de investigación, desarrollo tecnológico e innovación)*, 1: 30-43.
11. **Herold FC, Haas K, Colenbrander B, Gerber D.** 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl or AndroMed. *Theriogenology* 66: 1123-1130.
12. **Kaabi M et al.** 2006. Influence of breed and age on morphology and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix. *Theriogenology* 66: 1876-1883.
13. **Kershaw CM et al.** 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the trans-cervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225-1235.
14. **Macías A et al.** 2017. Technical note. A new device for cervical insemination of sheep-design and field test. *J Anim Sci* 95: 5263-5269.
15. **Masoudi R et al.** 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology* 74: 77-80.
16. **Mellisho E, Terrel W.** 2007. Tasa de no retorno después de inseminación intrauterina vía laparoscópica con semen congelado de carneros australianos. *Sitio Arg Prod Anim (APPA-ALPA)*, Cusco, Perú.
17. **Pau S et al.** 2019. Surgery on cervical folds for transcervical intrauterine artificial insemination with frozen-thawed semen enhances pregnancy rates in the sheep. *Theriogenology* 1: 126, 28-35.
18. **Pau S et al.** 2020. Reproductive performance following transcervical insemination with frozen thawed semen in ewes submitted to surgical incision of cervical folds (SICF). *Animals* 10: 1, 108.
19. **Paulenz H et al.** 2004. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology* 61: 1719-1727.
20. **Salamon S, Maxwell WM.** 1995a. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37: 185-249.
21. **Salamon S, Maxwell WM.** 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 38: 1-36.
22. **Salamon S, Maxwell WM.** 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
23. **Watson PF.** 2000. The causes of reduced fertility with cryo-preserved semen. *Anim Reprod Sci* 60: 481-492.
24. **Wulster MC, Lewis GS.** 2002. Development of a new trans-cervical artificial insemination method for sheep: Effects of a new trans-cervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 15: 58(7), 1361-1371.