

Porcentaje de Gestación y Partición en Ovejas Usando Inseminación Laparoscópica con Semen Congelado

M.G. Pérez^a*, T.L. Quispe^a, F. Quispe^a, E. Aguirre^b, M.L. Quispe^b, U.H. Pérez^b.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fertilidad del semen congelado manualmente en el campo, inseminando ovejas vía laparoscópica, sobre el porcentaje de gestación y partición en ovejas Corriedale. Se utilizaron 66 ovejas que se distribuyeron de la siguiente manera: Época reproductiva (Mayo-Junio) G=1) 12 ovejas se sincronizaron con dispositivos intravaginales (P₄, 0.3 g) por 14 días, G=2) 12 ovejas con control de celo natural y ambos grupos se inseminaron vía laparoscópica con semen congelado 12 a 14 h post detección de celo, G=3) 12 ovejas con celo natural se inseminaron con semen fresco en forma convencional (grupo control). En la época no reproductiva (Setiembre-Octubre) 30 ovejas se sincronizaron con esponjas preparadas que contenían 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) por 14 días y se colocaron 333.3 U.I. de eCG al momento de remover las esponjas, la inseminación en ambos grupos se realizó a tiempo fijo 52 a 56 h post remoción de la esponja, en el G=1) 15 ovejas se inseminaron con semen congelado vía laparoscópica y G=2) 15 ovejas se inseminaron con semen fresco diluido vía cervical que sirvió de grupo control. El diagnóstico de gestación se realizó a los 32 a 35 días post inseminación con ayuda de un ecógrafo Sonovet 600 con el transductor lineal vía rectal con una frecuencia 5 MHz y la partición se registró en el cuaderno de control. Los resultados fueron los siguientes: En época reproductiva se obtuvieron en el G=1) de 12 ovejas sincronizadas 9 (75.0%) gestantes y 8 (66.6%) con parto, G=2) de 12 ovejas con celo natural 8 (66.6%) gestantes y 7 (58.3%) con parto, G=3) de 12 ovejas control 9 (75.0%) gestantes y 8 (66.6%) con parto. Época no reproductiva se obtuvieron en el G=1) de 15 ovejas sincronizadas e inseminadas vía laparoscópica con semen congelado 10 (66.6%) gestantes y 8 (53.3%) con parto, G=2) de 15 ovejas sincronizadas inseminadas con semen fresco vía cervical 8 (53.3%) gestantes y 7 (46.6%) con parto. Ambos resultados de época reproductiva y no reproductiva fueron sometidos a la prueba de Chi-cuadrado donde no mostraron dependencia ($P > 0.05$). En conclusión, se puede usar el semen de carnero congelado a campo para inseminar vía intrauterina en ovejas sin reducir el porcentaje de gestación y partición en época reproductiva y época no reproductiva.

Palabras claves: Ovejas, semen congelado, inseminación intrauterina, gestación, partición.

^a Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.

^b Práctica privada

* guidpe@yahoo.es

1. INTRODUCCIÓN

Los protocolos de sincronización de celo en ovejas han sido desarrollados, utilizando dispositivos vaginales impregnados con diversas progesteronas para suprimir temporalmente el celo y la administración de gonadotropina coriónica equina al momento de remover el dispositivo vaginal con la finalidad de estimular la actividad ovárica para proveer mayor ovulación (Perkins *et al.*, 1996; Donrov *et al.*, 1998). La administración de progesterona y eCG en la época de anestro y transición a la época reproductiva inducen al estro de las ovejas, resultando con alta fertilidad después de la inseminación artificial con semen fresco vía cervical o congelado por laparoscopia (Zelege *et al.*, 2005; Luther *et al.*, 2007). Entre los recientes progresos en la congelación de semen de ovinos es la adición de antioxidantes que previenen cambios en la membrana de los espermatozoides y que esto mejora la fertilidad después de la inseminación cervical en las ovejas (Maxwell and Watson, 1996). La congelación del semen en pajillas de 0.25 ml, uso de diferentes dilutores, diferentes tiempos de descongelado (70 °C por 5 s, 50 °C por 9 s, 35 °C por 12 s). Posterior a una evaluación de laboratorio obtuvieron motilidades del 52.2% a la descongelación y tasas de no retorno después de la inseminación artificial del 58.8% (Paulenz *et al.*, 2004; Rodríguez-Gil *et al.*, 2007). La capacidad fertilizante del semen congelado/descongelado se mide en la hembra a través de la tasa de no retorno posterior a la inseminación artificial y la partición respectiva.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fertilidad in vivo inseminando ovejas con semen congelado de carneros, vía laparoscópica. El semen fue procesado manualmente en condiciones de campo, aplicando el protocolo que recomienda Heitland *et al.* (1996), quienes indican que para la congelación de semen, es necesario utilizar dilutores y crioprotectores adecuados, manejar curvas de enfriamiento, concentración de espermatozoides por dosis, relleno de las dosis, curvas de congelación y la descongelación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Colección y congelación del semen

El semen fue colectado de 2 carneros de tres años de edad de la raza Corriedale, de propiedad del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano. El semen fue colectado con vagina artificial, con una frecuencia de dos veces por semana durante los meses de abril y mayo del 2008. Solamente los eyaculados que tenían rangos normales recomendados



Fig. 1. Enfriamiento



Fig. 2. Congelación



Fig. 3. Sincronización

(Evans and Maxwell, 1987), se procesaron, con motilidades másales de 4 o 5 (de una escala de 0 a 5), concentraciones mayores a 3×10^9 espermatozoides/ml, el dilutor se preparó para una dilución de semen de 1: 4 (Tris 3.634 g, glucosa 0.5 g, ácido cítrico monohidratado 1.990 g, yema de huevo 15 g, glicerol 5 g, penicilina 100,000 U.I., estreptomycinina 100 mg, agua destilada c.s.p. 100 ml).

Posterior a la colección los eyaculados en los viales fueron colocados en baño María a 36°C dentro un vaso con un volumen de 200 ml de agua, la dilución inicial se realizó variando la proporción de 1:4 (Evans y Maxwell 1987) a la proporción de 1:1 semen:dilutor (Gil *et al.*, 2003). Para el enfriamiento el vaso que contenía al vial con semen pre-diluido fue colocado dentro una caja de tecnopor que contenía bolsas congeladas junto a sus paredes (Fig. 1), donde la temperatura interna estuvo a 0°C , el enfriamiento del semen pre-diluido hasta 5°C fue por espacio de 2 a 2.5 h, cuando la temperatura de enfriamiento alcanzó 12°C y para proseguir el ritmo de enfriamiento aproximado de 0.3°C por min, se colocó 1 g de hielo cada 3 min. Estando la muestra a 5°C se completo la dilución con el resto de dilutor (3 ml), se dejó por 1 h para la equilibración, seguidamente el semen se relleno en pajillas de 0.25 ml.

Para la congelación se adecuó el protocolo (Matsuoka *et al.*, 2006) en el aparato de congelación de embriones (Elsden, 1987) que tiene las siguientes características: Dispositivo de acero con un diámetro 3.5 cm, altura 12 cm, 10 excavaciones alrededor de la parte circular con una profundidad de 11.5 cm, en la parte central tiene una cremallera donde se le coloca una vara con agujeros cada 0.5 cm que tiene la finalidad de graduar la altura bajando o subiendo el dispositivo de acero dentro la boca del termo (3 L). El enfriamiento del dispositivo se realizó en la boca del termo donde se introdujo el dispositivo de acero hasta estar en contacto la base con la superficie del nitrógeno líquido. El enfriamiento del dispositivo fue monitoreado con un termómetro termocupla tipo K (de -200°C a 1000°C con una sensibilidad de 0.1°C), hasta -120°C . La congelación de las pajillas se realizó introduciendo dentro las excavaciones del dispositivo por espacio de 4 min y



Fig. 4. Detección de celo

finalmente las pajillas congeladas se introdujeron dentro el tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento hasta su uso (Fig. 2).

2.2. Sincronización y detección de celo

Para el estudio fueron designadas 54 ovejas de la raza Corriedale con experiencia de parto, las cuales se dividieron 24 ovejas para sincronizar en la época reproductiva (mayo-junio) y 30 para la época no reproductiva (setiembre-octubre).

1) En la época reproductiva 12 ovejas se sincronizaron insertando en la vagina un dispositivo vaginal comercial con 0.3 g de progesterona por 14 días (Fig. 3), a las 12 ovejas restantes se les controló el inicio de celo dos veces por día en la mañana 6 a.m., tarde 5 p.m. por 30 min con ayuda de 3 carneros vasectomizados (Fig. 4).

2) En la época no reproductiva el total de las ovejas (30) fueron sincronizadas insertando en la vagina, esponjas preparadas con 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), al momento de remover las esponjas, se les administró 333.33 U.I. de eCG vía intramuscular a estas ovejas no se les realizó la detección del celo.

2.3. Inseminación artificial

La inseminación artificial intrauterina se realizó de 12 a 14 h posterior a la detección del celo en las ovejas de época reproductiva y en las ovejas de época no reproductiva la inseminación se realizó a tiempo fijo 52 a 56 h después de la remoción del dispositivo vaginal.

Las pajillas se descongelaron a 37°C por 30 s. Al inicio de la inseminación la motilidad de los espermatozoides de cada pajilla fue evaluada bajo un microscopio óptico

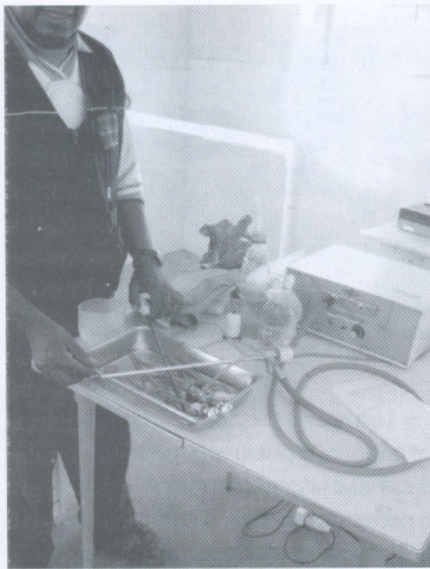


Fig. 5. Equipo



Fig. 6. Preparación

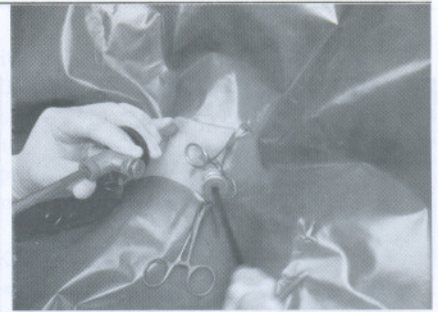


Fig. 7. Campo operatorio



Fig. 8. Ubicación de cuernos

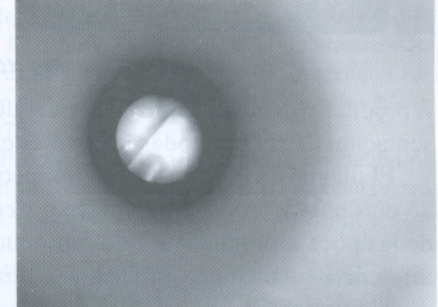


Fig. 9. Aplicación de dosis

co a 400x, donde las pajillas que tenían un porcentaje de motilidad progresiva subjetiva de aproximadamente el 50% fueron usadas para la inseminación artificial (Matsuoka *et al.*, 2006; Fukui *et al.*, 2008).

La inseminación artificial intrauterina se realizó con ayuda de un laparoscopio (Evans y Maxwell, 1987) con ciertas adecuaciones como se describe brevemente:

a) A las ovejas a inseminar se les puso en ayunas por más de 14 h para reducir el contenido del rumen y vejiga, **b)** se esquiló, rasuró e higienizó un área de 100 cm² delante de la ubre, **c)** la oveja se colocó sobre una mesa con una inclinación de 45° con la cabeza hacia abajo (fijada por los miembros), **d)** se colocó un campo de plástico en el área rasurada y en la piel se realizó la asepsia con solución de yodo, **e)** todo el material los trocares, telescopio se mantenían en solución desinfectante entibado, **f)** con la punta de un bisturí se insidió la piel en lado izquierdo a una distancia aproximada de 4 cm de la ubre y a 2.5 cm de la línea media y posteriormente con la cánula y trocar mayor se perforó la piel hasta llegar a la cavidad abdominal (con fuerza y con cuidado), **g)** se reemplazó el trocar con el telescopio y se insufló aire en la cavidad abdominal con ayuda de una bomba, para desplazar los intestinos y con la luz del telescopio se divisó el útero, vejiga a veces grasa, **h)** en el lado derecho de la línea media se incidió la piel y parte de músculo con la punta del bisturí a un centímetro más bajo de la primera incisión (izquierda) y seguidamente con la cánula y trocar menor se perforaron hasta llegar a la cavidad abdominal, **i)** el trocar menor se reemplazó con la pinza para acomodar el útero retirar el omento (grasa), **j)** la pajilla de semen descongelado se acondicionó con una aguja 24G donde la punta se cortó a 7 mm de largo y la parte posterior de la aguja se acomodó para que entre en la luz de la pajilla, se armó en el aplicador de semen de vacunos de tal forma que unos 5 mm de la

aguja sobresalía la punta de la funda, **k)** armado el aplicador se introdujo por el interior de la cánula menor, la punta de la aguja se dirigió hacia el cuerno uterino por encima de la bifurcación, localizado el lugar se realizó una punción con fuerza y con cuidado, se depositó la mitad de la dosis de semen por presión del embolo del aplicador y de la misma forma se realizó en el otro cuerno para depositar la otra mitad de la dosis (Figs. 5, 6, 7, 8, 9).

2.4. Diagnóstico de gestación y parición

El diagnóstico de gestación se realizó entre los 32 a 35 días posteriores a la inseminación, con ayuda de un ecógrafo (Sonovet 600), con un transductor lineal con una frecuencia de 5MHz por vía rectal (Fig. 10). La parición de las ovejas fueron registrados en el cuaderno de control (Fig. 11).

2.5. Estadístico

El porcentaje de gestación y parición de las ovejas inseminadas fueron analizados usando la prueba de Chi-cuadrado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el grupo de las ovejas sincronizadas con dispositivo intravaginal (0.3 g de progesterona) en la época reproductiva se controló el celo, donde el 100% de ovejas (12) presentaron el inicio del celo a las 49.3±3 h, posterior a la remoción del dispositivo intravaginal. La respuesta de celo del 100% en el presente estudio fueron comparados con valores similares, con el mismo tipo de tratamiento y para la misma época (Luther *et al.*, 2007). Mientras existió una pequeña discrepancia con el 97% de presentación de celo tras la sincronización con dispositivos intravaginales con progesterona más eCG, pero en la época de transición de anestro (Zelege *et al.*, 2005). Esta pequeña diferencia es debido a que el presente estudio se llevó a cabo en época



Fig. 10. Ecografía



Fig. 11. Crías

reproductiva (mayo-junio), factor que favoreció la presentación de celo en todas las ovejas en estudio.

El diagnóstico de gestación por ecografía entre lo 32 a 35 días post inseminación vía laparoscópica, en las ovejas de la época reproductiva y no reproductiva no mostraron diferencia estadística (Tabla 1 y 2). En estas gestaciones se demuestra una similar eficiencia de la capacidad fertilizante del semen congelado en las ovejas Corriedale con celo natural y sincronizadas con el dispositivo intravaginal con 0.3 g de progesterona en la época reproductiva, como también en las ovejas sincronizadas con esponjas de MAP más eCG en la época no reproductiva.

Sin embargo comparando con reportes en la literatura, el porcentaje de gestación en las ovejas sincronizadas con el dispositivo intravaginal con 0.3 g de progesterona en la época reproductiva fue del 75.0% (9/12) siendo superior comparado al 44.4% (4/9) de gestación (Luther *et al.*, 2007) que utilizaron el mismo protocolo que en el presente estudio, dicha diferencia se debe a que dichos autores realizaron la inseminación vía laparoscópica a tiempo fijo entre las 54 a 60 h post remoción del dispositivo intravaginal y en cada cuerno depositaron 25×10^6 espermatozoides móviles. Mientras que en el presente estudio la inseminación intrauterina se realizó 12 a 14 h después de la detección del celo, próximo a la ovulación y en cada cuerno uterino se depositó aproximadamente 40×10^6 espermatozoides móviles, factores que influenciaron el resultado y corroborado por D'Alessandro *et al.*, (2001), quienes indican que la fertilidad en la inseminación con semen congelado en ovinos es afectado por sobrevivencia a la descongelación, concentración de espermatozoides, composición de los dilutores.

Tabla 1
Porcentaje de gestación y parición en ovejas inseminadas por laparoscopia en época reproductiva.

Tratamiento	Ovejas inseminadas	Gestación %	Parición %
Sincronizadas	12	9 (75.0)	8 (66.6)
Celo natural	12	8 (66.6)	7 (58.3)
Control	12	9 (75.0)	8 (66.6)

El porcentaje de gestación del 66.6% (10/15) en las ovejas inseminadas vía laparoscópica en la época no reproductiva del presente estudio, fue similar a los resulta-

dos del 64.0 y 64.5% (Fukui *et al.*, 2002; Fukui *et al.*, 2008), a pesar que los autores aplicaron una ligera variación para sincronizar las ovejas con esponjas y dispositivos intravaginales de progesterona por 12 días y administrando 500 U.I. de eCG un día antes de remover los dispositivos e inseminaron a tiempo fijo de 40 a 52 h post remoción de los dispositivos intravaginales, depositaron 50×10^6 espermatozoides en cada cuerno con una motilidad aproximada del 50%. Pero el 66.6% de gestaciones del presente estudio fue superior al 54% de gestación (Perkins *et al.*, 1996), autores que aplicaron un similar protocolo de sincronización con esponjas de 40 mg de flurogestone, administraron 400 U.I. de eCG al momento de remover el dispositivo e inseminaron vía laparoscópica a tiempo fijo 52 a 62 h posterior a la remoción de las esponjas, además indican que la mitad de ovejas fueron inseminadas intrauterinamente en un solo cuerno, factor que afectó a sus resultados.

Tabla 2.
Porcentaje de gestación y parición en ovejas inseminadas por laparoscopia en época no reproductiva.

Tratamiento	Ovejas inseminadas	Tipo inseminación	Tipo semen	Gestación %	Parición %
Sincronizadas (P4 y eCG)	15	Laparoscópica	Congelado	10(66.6)	8(53.3)
Control sincronizadas (P4 y eCG)	15	Cervical	Fresco	8(53.3)	7(46.6)

El porcentaje de parición para las dos épocas posterior a la inseminación fueron similares estadísticamente (66.6 y 53.3%), después de la inseminación laparoscópica en época reproductiva y no reproductiva respectivamente, pero hubo una disminución del 8.3 y 6.6% de pérdida embrionaria para la época reproductiva y no reproductiva respectivamente. El porcentaje de parición del 66.6% (Tabla 1. IA en época reproductiva) fue ligeramente inferior al 69% (King *et al.*, 2004) quienes aplicaron un protocolo de sincronización con progesterona por 12 días y 400 U.I de eCG al remover el dispositivo, en época reproductiva en ovejas de cruce Leicester, indican que la eCG que aplicaron, favoreció en la superioridad de parición en este estudio, por activar más el ovario de las ovejas. Mientras que en el presente estudio para sincronizar a las ovejas en la

época reproductiva sólo se utilizaron dispositivos de progesterona (0.3 g), con posterior detección de celo para la inseminación vía laparoscópica.

Mientras que el porcentaje de parición producto de la inseminación en la época no reproductiva del 53.3%, fue menor al 64.0 y 64.5% (Fukui *et al.*, 2002; Fukui *et al.*, 2008) respectivamente, con pariciones sin pérdida embrionaria, debido al manejo adecuado y alimentación que dieron durante la gestación en sus estudios respectivos (300 g de concentrado diario), lo que no sucedió en el presente estudio, donde las ovejas gestantes se mantuvieron hasta la parición en pastos naturales y suplementación de ensilado de alrededor de 1 kg por oveja por día un mes antes de la parición, factor que afectó en la pérdida embrionaria y por ende la disminución en la parición.

En conclusión el semen de carneros congelado manualmente en el campo, a la descongelación tuvo más del 50% de motilidad progresiva subjetiva, la misma que inseminando intrauterinamente vía laparoscópica produjo porcentajes de gestación y parición similares a los resultados del semen de carneros procesados con protocolos de congelación en laboratorios especializados.

Agradecimiento

Los autores agradecen al M.Sc. Julio Málaga, Director del Centro de Investigación y Producción de Chuquibambilla, por el apoyo en animales. Al MVZ Yodis Quispe personal del megalaboratorio de criopreservación y transferencia de embriones. Al personal administrativo del CIP Chuquibambilla por su apoyo en el manejo de los animales.

Bibliografía

- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colona MA, Belliti A. Post-thaw of ram spermatozoa and fertility alter insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology* 2001; 55:1159-1170.
- Donrov TS, Batsaihan D, Ley WB. Gonadotropin extraction from pregnant mares serum and effect of PMSG preparation on the fertility of Mongolian native ewes. *Small Ruminant Res.* 1998; 28:61-66.
- Elsden RP. Manual for embryo transfer. 1987. Peter Elsden and associates, Inc. 6599 Country Rd. 29C, Bellvue, CO 80512. USA
- Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. London: Butterworth; 1987.
- Fukui Y, Iida K, Okada A, Zyouzyou Y, Wachi S, Togawa M. Fertility of estrus-induced ewes during the non-breeding season and artificially inseminated with frozen semen imported from New Zealand. *J Reprod Dev* 2002; 48:485-488.
- Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasi M, Okabe K. Fertility alter artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J Reprod Dev* 2008; 54:286-289.
- Gil J, Lundeheim N, Soderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 2003; 59:1241-1255.
- Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Gram JK, Pickett BW, Hamilton C. 1996. Factors affecting motion characteristic of frozen-tawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 1996; 28, 47-53.
- King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, Stewart, Robinson JJ. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/

thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 2004; 62:1236-1244.

- Luther JS, Grazul-Bilska AT, Kirsch JD, Weigl RM, Kraft KC, Navanukraw C, Pant D, Reynolds LP, Redmer DA. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Res.* 2007; 72:227-231.
- Matsuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-tawed ram spermatozoa. *J Reprod Dev* 2006; 52:675-683.
- Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 1996; 42:55-65.
- Paulenz H, Soderquist L, Adnoy T, Nordstoga A, Gulbrandsen B, Berg KA. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology* 2004; 61:1719-1727.
- Perkins NR, Hill JR, Pedrana RG. Laparoscopic insemination of frozen-tawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. *Theriogenology* 1996; 46:541-545.
- Rodríguez-Gil JE, Silvers G, Flores E, Palomo MJ, Ramirez A, Rivera MM, Castro M, Brito M, Bucher D, Correa J, Concha H. Expression of the GM-CSF receptor in ovine spermatozoa: GM-CSF effect on sperm viability and motility of sperm subpopulations after the freezing-tawing process. *Theriogenology* 2007; 67:1359-1370.
- Zelege M, Greyling JPC, Schwabach LMJ, Muller T, Erasmus JA. Effect of progestagen and PMSG on oestrus synchronization and fertility on Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Res.* 2005; 56:47-53. (MV)

Agenda

III CURSO INTERNACIONAL

Tecnologías Innovativas en Mejoramiento Genético para una Ganadería Sustentable

22 y 23 OCTUBRE 2010




PONENTES

- Ph. D. WILLIAM VIVANCO MACKIE
Utah State University, Universidad Nacional Agraria, L. Molina / Perú
- Ph. D. CARLOS ANTONIO DE CARVALHO FERNANDES
Universidade Federal de Lavras, Lavras - Minas Gerais - Brasil
- Ph. D. GUSTAVO A. TORO
Sering Technologies / USA
- Ph. D. SALVADOR ROMO GARCIA
Universidad Nacional Autónoma de México / México
- Ph. D. MIKE KJELLAND
Sering Technologies / USA

ORGANIZA
Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, INDES-CES

COSTO
S/ 100.00 alumnos.
S/ 250.00 profesionales y público en general.

Informes e inscripciones:
Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, INDES-CES
Ciudad Universitaria Telf: 041-479030
Informes@indes-ces.edu.pe / www.indes-ces.edu.pe
www.unalamazonas.edu.pe

CHACHAPOYAS - AMAZONS - PERU

