

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO EN OVEJAS POR VÍA VAGINAL Y CERVICAL EN EL ALTIPLANO PERUANO

Artificial insemination with frozen semen in sheep by vaginal and cervical in the Peruvian Highlands

M.G. Perez<sup>1,2</sup>, T.L. Quispe<sup>1,2</sup>, J. Malaga<sup>2</sup>, Y. Quispe<sup>2</sup>, U.H. Perez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Reproducción Animal, <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de Bovinos y Ovinos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú,

<sup>3</sup>Practica privada.

E-mail: guidpe@yahoo.es

### INTRODUCCION

La población de ovinos en el Perú se concentra en los andes y más del 70% de esta población está en manos de los pequeños productores, sin ninguna mejora de la calidad genética. A nivel mundial el uso de semen congelado para inseminación artificial en ovinos por vía cervical y vaginal a nivel de campo se inicio en el país de Noruega (Paulenz *et al.*, 2004; Nordstoga *et al.*, 2009), las inseminaciones fueron ejecutadas por los propios dueños de los rebaños en la época reproductiva en celo natural, posterior a un entrenamiento sobre la técnica de inseminación, donde lograron del 50,2 al 71,0% de pariciones. Por tal razón, el objetivo del presente trabajo es determinar la fertilidad *in vivo* inseminando ovejas con semen congelado/descongelado, por vía cervical y vaginal, en época reproductiva con celo natural.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El semen fue colectado de 2 carneros de tres años de edad de la raza Criolla, de propiedad del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, Universidad Nacional del Altiplano Puno - Perú. El semen se colectó con vagina artificial en una frecuencia de dos veces/semana. Los eyaculados con volúmenes >1 mL, concentraciones >2,5 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/mL, motilidad progresiva >70% y morfología <10% se procesaron, según recomendaciones de Gil *et al.* (2003).

El dilutor se preparó realizando ligeras modificaciones (Gil *et al.*, 2003), adecuando a las condiciones del laboratorio. La leche en polvo descremada (11% w/v), se diluyó en agua destilada, esta mezcla se calentó aproximadamente a 90°C por 10 min dentro un hervidor de agua, se enfrió a medio ambiente y luego se proceso. La fracción 1 consistió en la mezcla de la leche con 10% de yema de huevo, esté preparado se centrifugó a 2000 x g a 7°C por 30 min para eliminar las partículas grandes en el sedimento, el sobrenadante se extrajo y se filtro en una membrana de 0.7 µm, con la finalidad de eliminar los gránulos de grasa (>70 µm de diámetro). A esta fracción 1 se le adicionó penicilina 0.03 g/100 mL y estreptomina 0,04 g/100 mL. Para convertir en fracción 2, a la fracción 1 se adicionó 224 mM de fructosa y glicerol (14% v/v).

Las colecciones una vez valoradas se procedió a diluir con la fracción 1 donde la mezcla tuvo 1,6 x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL (proporción 1:1 en forma práctica), el tubo graduado con semen pre-diluido protegido en baño de agua de 200 mL (36°C), se enfrió hasta los 5°C por espacio de 1 h dentro un tecnopor que contenía bolsas de agua congeladas junto a sus paredes formando un cavidad, la temperatura interna se mantenía a 0°C. La segunda dilución con la fracción 2, se realizó calculando que cada mL de semen mezclado tenga 0.8 x 10<sup>9</sup> espermatozoides /mL (1:1 en forma práctica). La muestra diluida con la fracción 2 se mantuvo por 1,5 h (a 5°C) para su equilibración, se rellenó en pajillas identificadas de 0,25 mL (Gil *et al.*, 2003). Para la congelación de las pajillas se utilizo el aparato manual de congelación de embriones 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 de nitrógeno líquido (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 finalmente las pajillas congeladas se introdujeron dentro el tanque para su almacenamiento hasta su uso (Pérez *et al.*, 2010). Para la inseminación se asignaron 75 ovejas criollas con experiencia de parto y se distribuyeron de la siguiente manera: 25 ovejas para inseminar con semen congelado por vía cervical, 25 ovejas para inseminar vía vaginal y 25 ovejas control para inseminar con semen fresco (método tradicional). La inseminación artificial se realizó en época reproductiva

(Junio 2010). La detección de celo se realizó con ayuda de machos vasectomizados y las ovejas se inseminaron 12 o 14 h posterior a la detección del celo y las ovejas que retornaron en celo se volvieron a inseminar. Las pajillas se descongelaron a 35°C por 30 s. Al inicio de la inseminación la motilidad de los espermatozoides de cada pajilla fue evaluada bajo un microscopio óptico a 400X, donde las pajillas que tenían un porcentaje de motilidad progresiva subjetiva de aproximadamente del 50% fueron usadas para la inseminación (Matsouka *et al.*, 2006). Para la inseminación artificial propiamente dicho (deposición del semen) se utilizó el aplicador de semen de vacunos. El diagnóstico de gestación se realizó entre los 32 a 35 días posteriores a la inseminación, con ayuda de un ecógrafo (Sonovet 600), con el transductor lineal con una frecuencia de 5MHz por vía rectal. El porcentaje de gestación de las ovejas inseminadas se analizó mediante la prueba de Chi-cuadrado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio a la primera IA por el método cervical se obtuvieron 11/25, vaginal 10/25 y control 20/25 ovejas gestantes. Las ovejas que retornaron en celo se re-inseminaron por segunda vez obteniéndose 6/14, 6/15 y 3/5 gestantes para los métodos cervical, vaginal y control respectivamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Métodos de IA sobre los porcentajes de gestación y parición

|                              | MÉTODO DE IA |         |         |          |
|------------------------------|--------------|---------|---------|----------|
|                              | Cervical     | Vaginal | Control |          |
| <b>N</b>                     | 25           | 25      | 25      |          |
| <b>Tasa de gestación (%)</b> | 17 (68)      | 16 (64) | 22 (88) | (p≥0,05) |

Los resultados de gestación final posterior a la inseminación artificial por vía cervical (68 %) comparado con la literatura reportada, medidos en porcentaje de fertilidad del 38,1, 30,0 y 58,3 % (Soderquist *et al.* 1999) de tres carneros diferentes, donde la descongelación de las pajillas del semen realizaron a 50 °C por 9 s y 70 °C por 5 s y recomiendan que la descongelación a temperatura más baja facilitaría el uso práctico del semen congelado en condiciones de campo. Paulenz *et al.* (2004), reportaron resultados superiores con el 72,9% de gestaciones, lograron por un manejo racional del semen para la IA en pajillas de 0,25 mL y descongelados a 35 °C, técnica que también se utilizó en el presente estudio.

Los resultados de gestación del 64% del presente estudio producto de la IA vía vaginal supera al 58,3% (Nordstoga *et al.*, 2009), donde los autores indican que existen diferencias en gestación y parición debido a factores como la fertilidad de cada macho, la alimentación, manejo, etc. Cabe indicar que esta superioridad en el porcentaje de gestación en el presente estudio es producto de la re-inseminación de las ovejas que retornaron al celo.

## CONCLUSIÓN

El semen congelado de carneros con modificaciones al protocolo original produce tasas de gestación y parición satisfactorias, abriéndose la posibilidad de aplicar esta técnica de inseminación artificial con semen congelado vía cervical o vaginal en condiciones de campo en el altiplano peruano.

## REFERENCIAS

- Gil, J., Lundeheim, N., Soderquist, L., Rodríguez-Martinez, H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59: 1241-1255.
- Matsouka, T., Imai, H., Kohno, H., Fukui, Y. 2006. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-tawed ram spermatozoa. *J Reprod. Dev.* 52: 675-683.
- Nordstoga, A., Soderquist, L., Adnoy, T., Paulenz, H. 2009. Effect of different packages and freezing/thawing on fertility of ram semen. *Reprod. Dom. Anim.* 44: 527-531.
- Paulenz, H., Soderquist, L., Adnoy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B., Berg, K.A. 2004. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology* 61: 1719-1727.
- Pérez, M.G., Quispe, T.L., Quispe, F., Aguirre, E., Quispe, M.L., Pérez, U.H. 2010. Porcentaje de gestación y parición en ovejas usando inseminación laparoscópica con semen congelado. *Revista de Ciencias Veterinarias* 26(3). Lima
- Soderquist, L., Lundeheim, N., Nilsson, B. 1999. Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 61-66.