

**EFEECTO DEL TIEMPO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DESPUÉS
DE LA DETECCIÓN DE CELO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ
EN OVINOS CORRIEDALE¹**

**Effect of time of artificial insemination after estrus detection on
Corriedale sheep pregnancy rates¹**

Camila Muñoz M.^{2*}, Víctor H. Parraguez G.³ y Etel Latorre V.⁴

A B S T R A C T

A total of 240 adult Corriedale ewes from the Magallanes Region of Chile, were synchronized with progestagens and randomly assigned to one of four groups, according to the time elapsed between estrus detection and artificial insemination (AI) with semen obtained from 2 Corriedale rams. The first three groups were inseminated at 3 and 6; 6 and 12; or 12 and 18 h after estrous detection; the fourth group received a single insemination 18 h after estrous detection. Semen was extracted and frozen in a solution of skimmed milk, glycerol and egg yolk, thawed and used, registering the depth of semen placement in the cervix and the quantity and nature of the cervical mucosa. Pregnancy was assessed by ultrasound 30 days after insemination. No significant statistical differences were detected among pregnancy rates, which were 22; 31; 22; and 21% for groups 1; 2; 3 and 4, respectively. Nor were there significant differences with one or two inseminations. Results showed that fertility did not differ when insemination was performed 3 to 18 h after estrous detection, and that double insemination is not necessary, as long as insemination coincides with the middle of the estrous period.

Key words: artificial insemination, frozen semen, intracervical insemination.

R E S U M E N

Un total de 240 ovejas Corriedale fueron sincronizadas con progesterona y asignadas al azar a 4 grupos, según el tiempo transcurrido entre la detección de celo y la inseminación artificial (IA) con semen de carneros de la misma raza. Los primeros 3 grupos fueron inseminados luego de 3 y 6, 6 y 12; ó 12 y 18 h de detectado el celo; el cuarto grupo recibió una sola inseminación 18 h después de detectado el celo. El semen fue extraído y congelado en una solución de leche descremada, glicerol y yema de huevo, descongelado y usado, registrándose la profundidad de depositación del semen en el cervix y la cantidad y naturaleza de la mucosa cervical. Treinta días después se determinó la preñez mediante ecografía. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de preñez, que fueron de 22; 31; 22; y 21%, para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Tampoco fueron significativas las diferencias en fertilidad con una o dos inseminaciones.

Palabras clave: inseminación artificial, semen congelado, inseminación intracervical.

¹Recepción de originales: 11 de marzo de 2001.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Experimental Rayentué, España 512, 2° piso, San Fernando, Chile. E-mail: cmuñoz@rayentue.inia.cl *Autor para correspondencia.

³Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Casilla 2 - Correo 15, La Granja, Santiago, Chile. E-mail: vparragu@uchile.cl

⁴Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Kampenaike, Casilla 277, Punta Arenas, Chile. E-mail: elatorre@kampenaike.inia.cl

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) permite fundamentalmente la rápida y masiva difusión de las características deseables de los reproductores con alto potencial productivo, permite usar carneros viejos o lesionados u ovejas ubicadas en lugares distantes y, además, permite el control de algunas enfermedades de transmisión sexual (Parraguez *et al.*, 2000). La IA con semen congelado tiene la ventaja adicional de poder conservar el semen por largos períodos previo a su uso (McDonald *et al.*, 1998).

El uso de semen congelado en ovinos se inició sistemáticamente en 1972, cuando Andersen y Aamdal (1972), utilizando esta técnica, llegaron a obtener por primera vez un 5% de fertilidad. A partir de entonces, se han realizado numerosos ensayos, usando semen congelado para evaluar componentes y concentraciones del diluyente a usar, los tipos de envasado, el método de congelación y descongelación, la técnica de inseminación más efectiva, etc. En el estado actual de desarrollo de esta técnica se han obtenido resultados muy variables, con fertilidades que oscilan entre 0 a 60% (Eppleston y Maxwell, 1993), siendo en general, muy inferiores a los porcentajes de preñez logrados con semen fresco.

La baja fertilidad obtenida al usar esta técnica se atribuye a un defectuoso transporte del semen a través del cervix (Lightfoot y Salamon, 1970; Gusstafson, 1978) y a la viabilidad reducida que presentan los espermatozoides en el tracto genital de las ovejas (Salamon y Maxwell, 1995). Adicionalmente, se mencionan como causas de los bajos rendimientos, la mortalidad embrionaria post-inseminación, reacciones inmunológicas en el canal cervical, características de la mucosa al momento de realizar la inseminación, o al estrés a que son sometidas las ovejas durante el proceso de inseminación (Salamon y Maxwell, 1995).

La técnica laparoscópica, en la cual el semen se deposita directamente dentro de los cuernos uterinos, es la que ha dado mejores resultados cuan-

do se utiliza semen congelado (Ritar y Ball, 1993; Azzarini y Valledor, 1998). Sin embargo, esta técnica es cara y difícil de practicar a gran escala. Se requiere, por lo tanto, desarrollar una técnica intracervical (en la cual el semen se deposita dentro del cervix mediante una técnica no invasiva) más eficiente, ya que es más económica al utilizar equipos de menor valor, y puede ser realizada por personal técnico adecuadamente capacitado, a una velocidad consistente con el manejo de rebaños de tamaño mediano a grande. En Chile, la IA en ovinos ha sido utilizada usando semen fresco y semen congelado, tanto por vía laparoscópica como por vía intracervical (Latorre, 2001).

En el presente estudio se aborda la eficiencia de la IA intracervical con semen congelado. El objetivo fue determinar el momento óptimo para realizar la IA con semen congelado, en un tiempo fijo luego de la detección de celo, y comparar la IA única respecto de IA doble, sobre la fertilidad (porcentaje de preñez) resultante.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo durante la temporada reproductiva del año 1998, en la Estancia Tehuel Aike Sur, ubicada a 35 km al norte de la ciudad de Punta Arenas (52°42' lat. Sur; 70°54' long. Oeste). Se utilizaron 240 hembras Corriedale de seis dientes, alimentadas en forma extensiva sobre la base de praderas naturales compuestas fundamentalmente por coirón (*Festuca gracillima*), coirón blanco (*Festuca pallescens*), y trébol blanco (*Trifolium repens*).

A las ovejas se les colocó un dispositivo intravaginal con hormonas análogas a la progesterona (EAZI-BREED CIDR G®, Pharmacia & Upjohn Cía. Ltda.) durante 12 días, con el objeto de sincronizar su ciclo estral. Una vez retirados los dispositivos se realizó la detección de celo con carneros vasectomizados, que fueron pintados ventralmente con una mezcla de tierra de color y aceite, los que identifican y marcan a la oveja en celo. Las ovejas en estro se apartaron diariamente

del rebaño a las 08:30 y a las 20:30 h, siendo distribuidas al azar en 4 grupos, correspondientes a los 4 tratamientos utilizados. Los tratamientos consistieron en diferentes tiempos de IA, luego del aparte de las ovejas en celo, recibiendo el grupo 1, 2 y 3 inseminaciones dobles, a diferencia del tratamiento 4 que consistió en IA única (Cuadro 1).

El semen se extrajo con vagina artificial desde dos carneros reproductores Corriedale, de 10 años de edad, de fertilidad probada. A cada eyaculado se le hizo una evaluación macroscópica de volumen, color, olor, y movimiento de masa, y una evaluación microscópica de movimiento progresivo y concentración espermática. El semen extraído se congeló de inmediato, usando la técnica Sueco-Noruega descrita por Grøtte (1995) y modificada por Latorre (1998), que consistió en la dilución del semen sobre la base de leche descremada, yema de huevo y glicerol. El semen fue envasado en pajuelas de 0,25 mL conteniendo 200 millones de espermatozoides por pajueta. Las pajuelas se descongelaron, previo a su uso, en un baño de agua a 35 °C por 10 s.

El procedimiento de inseminación consistió en la limpieza externa de la vulva y la introducción de un espéculo, con una fuente de luz, dentro de la vagina para ubicar la apertura cervical. Una vez identificado, la pipeta de inseminación se pasó a través del espéculo y dentro del cervix,

depositando el semen lo más adentro posible, de acuerdo a las características anatómicas particulares de cada oveja, ya que el éxito de esta operación es variable debido a la complejidad anatómica individual del cervix de la oveja. La inseminación la realizó un único inseminador, por vía intracervical, registrando para cada oveja el carnero utilizado y la profundidad con que el inseminador depositó el semen en el tracto de la hembra. Se registró también la característica que presentaba el mucus cervical al momento de la inseminación, usando una escala de 1 a 3, según el grado de enrojecimiento de la mucosa vaginal y las características físicas del mucus, donde 1 correspondió a mucosa muy enrojecida, con un fluido claro y filante; en cambio 3, correspondió a mucosa cervical pálida con fluido espeso y lechoso. Dado que la mayoría de las hembras recibió doble IA, se registraron comúnmente dos valores para la calificación de la característica de celo.

Treinta días después de inseminadas las hembras, se efectuó un diagnóstico de gestación usando ultrasonografía, mediante un ecógrafo de tiempo real modo B con un transductor transrectal de 5 MHz (Scanner 100LC VET. PIE MEDICAL, modelo 41514, ATM S.A., Santiago, Chile).

Para analizar los resultados se construyeron tablas de contingencia para cada variable en relación con la variable diagnóstico, a las que se

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la inseminación artificial con semen congelado/descongelado de ovejas Corriedale en la Región de Magallanes, Chile, 1998

Table 1. Experimental treatments used for intracervical artificial insemination of Corriedale ewes with frozen/thawed semen in the Magallanes Region, Chile, 1998

Tratamiento	Hora del aparte	Hora de la primera IA	Hora de la segunda IA	Tiempo entre el aparte y la IA (h)	Tiempo estimado desde inicio del celo (h)	
					Mínimo	Máximo
1	08:30	11:00	14:30	3 y 6	2,5	18
2	08:30	14:30	20:30	6 y 12	6	24
3	20:30	08:30	14:30	12 y 18	12	30
4	20:30	—	14:30	>18	12	30

les aplicó la prueba de chi-cuadrado. Adicionalmente, los datos fueron sometidos a una regresión logística con el fin de estudiar el efecto de múltiples variables explicatorias sobre una variable respuesta dicotómica (Motulsky, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad seminal de los carneros fue sobresaliente, ya que produjeron en promedio $1,6 \pm 0,5$ mL de semen, con una concentración espermática de $3,9 \pm 1,2 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} . Este valor está sobre el promedio reportado para la especie, que es de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} (Jainudeen y Hafez, 1987), lo que puede atribuirse a la baja frecuencia de extracción de semen, y a un adecuado manejo nutritivo (dieta balanceada, rica en energía y proteína) (Smith y Knight, 1998). El semen de los dos carneros utilizados no generó diferencias estadísticamente significativas en la fertilidad de las ovejas inseminadas.

La eficiencia de la inseminación expresada como porcentaje de preñez o fertilidad lograda en los distintos tratamientos fue en promedio de 24,1%. Otros autores han logrado fertilidades de 57% (De Lucia Silva, 1997), 52 y 33% (Olafsson, 1980), 14% (Ritar y Ball, 1993), 12% (Rodríguez *et al.*, 1998) y 9 y 5% (Azzarini y Valledor, 1998). El porcentaje de ovejas inseminadas que repitieron el calor fue de 61,4% (140 hembras de 228 inseminadas). Es importante señalar que el ensayo se realizó cerca del fin de la temporada reproductiva, julio de 1998, lo que determina una menor fertilidad potencial, debido a ciclos estrales irregulares, ya sea en extensión, presentación y/o manifestación o, más aún, en aciclia (Jainudeen y Hafez, 1987). A pesar de lo anterior, en la Región de Magallanes el encaste se hace normalmente tarde, para favorecer la supervivencia de las crías, que nacen cuando las temperaturas son más benignas, sacrificando levemente los porcentajes de preñez.

Por otra parte, la inseminación se realizó en el primer ciclo estral tras la sincronización de las ovejas con análogos de progesterona. Este celo es generalmente de menor fertilidad, presumiblemente por un efecto adverso del tratamiento sobre el transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra (McDonald *et al.*, 1998).

Los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas entre ellos ($p < 0,10$), lo que sugiere que ni la hora del aparte ni el tiempo transcurrido entre éste y la inseminación, dentro de los rangos de este estudio, son relevantes para mejorar la fertilidad (Figura 1).

Algunos autores sugieren usar inseminaciones dobles para incrementar la fertilidad, pero el efecto logrado dependerá del momento en que se realice la inseminación una vez iniciado el estro, ya que si una de las inseminaciones se realiza en la mitad del estro, generalmente no vale la pena repetir la inseminación (Salamon y Maxwell, 1995). Esto se corrobora en nuestro ensayo, al comparar los resultados obtenidos en el tratamiento 3 con el 4. En efecto, el porcentaje de fertilidad en el tratamiento 3 (IA doble) fue de 21,7%, en tanto que en el tratamiento 4 (IA única), fue de 20,5%, valores que no fueron estadísticamente diferentes.

En relación con los registros realizados para cada IA sobre profundidad a la que se depositó el semen en el tracto genital de las ovejas, éste varió de 0 (cuando no se penetró el cervix) a 4 cm. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,10$) en las fertilidades con las distintas profundidades de inseminación (Figura 2). Estos resultados se contraponen con los reportados por Eppleston *et al.* (1994) quienes señalaron que la fertilidad aumenta entre 7 y 12% por cada centímetro de mayor profundidad a la que se deposita el semen. Esto podría deberse al diferente grado de manipulación que implica la tracción mecánica ejercida sobre el tracto reproductivo al realizar IA, lo que alteraría las características físico-químicas del tejido cérvico-uterino por inflamación.

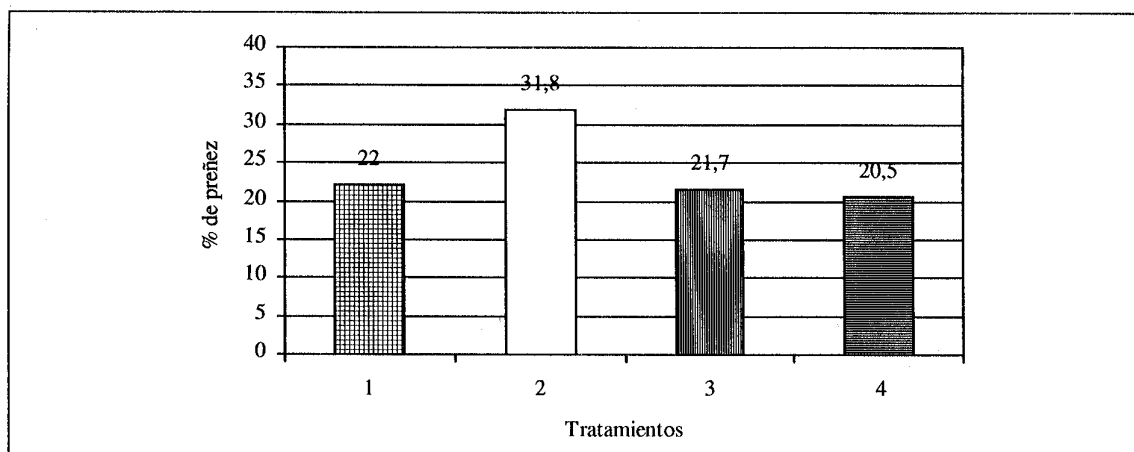


Figura 1. Porcentaje de preñez obtenido con inseminación artificial intracervical al usar semen congelado/descongelado en ovejas Corriedale según el tiempo transcurrido desde el inicio del celo, y con una o dos inseminaciones. 1998.

Figure 1. Pregnancy percentage obtained with intracervical artificial insemination using frozen/thawed semen in Corriedale sheep considering single or double inseminations and time elapsed between the detection of estrous and AI. 1998.

Tratamiento 1: inseminación artificial 3 y 6 h después del aparte. Tratamiento 2: inseminación artificial 6 y 12 h después del aparte. Tratamiento 3: inseminación artificial 12 y 18 h después del aparte. Tratamiento 4: inseminación artificial única 18 h después del aparte.

Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ($p < 0,10$).

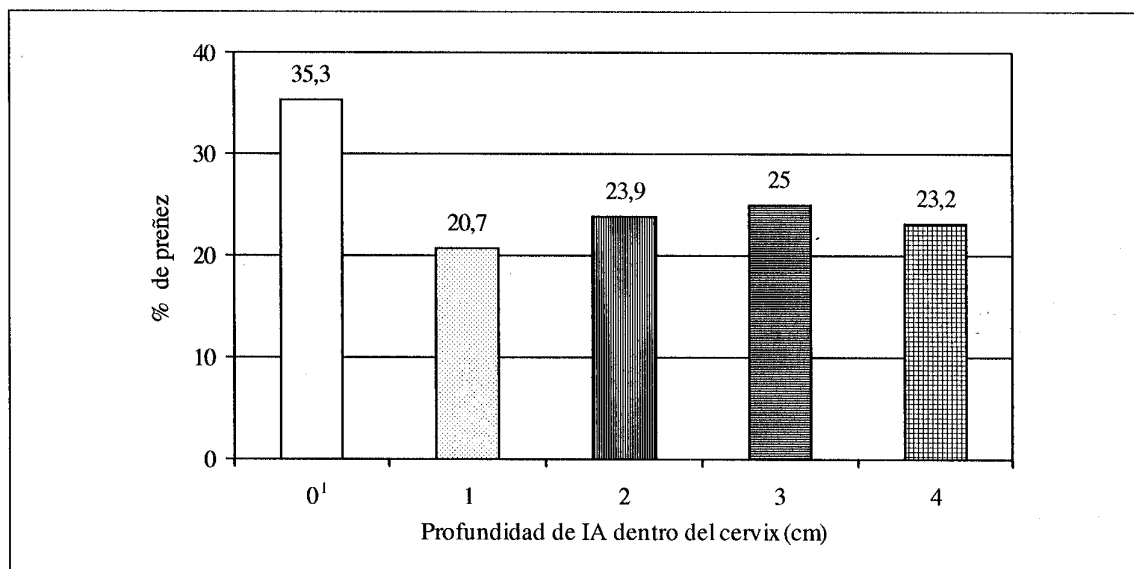


Figura 2. Efecto de la profundidad de deposición del semen en el cervix sobre la fertilidad (porcentaje de preñez) al inseminar artificialmente ovejas Corriedale con semen congelado/descongelado vía intracervical.

Figure 2. Effect of the depth of semen deposition into the cervix on the fertility (pregnancy percentage) on artificially inseminated Corriedale ewes using frozen/thawed semen.

Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ($p < 0,10$). IA: inseminación artificial.

¹No hubo penetración.

Las características del celo no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,10$). Sin embargo, en términos cuantitativos se observa que la característica 1 a 2, es decir, cuando la mucosa está enrojecida y el fluido es claro y filante, fue la que resultó en niveles de fertilidad más altos (47,4%). La fertilidad más baja (11,1%) se obtuvo cuando las inseminaciones se realizaron cuando el celo se calificó como 3, es decir, cuando la mucosa vaginal estaba poco enrojecida y el fluido fue poco abundante, lechoso y espeso (Figura 3). Esto concuerda con lo descrito ampliamente en la literatura, en el sentido que cuando el mucus cervical es fluido y claro, característica que generalmente se presenta en la primera mitad del celo, se obtienen los más altos índices de preñez (Duran del Campo, 1993; Blank, 1998).

CONCLUSIONES

La inseminación artificial intracervical, utilizando semen almacenado mediante congelamiento, bajo las condiciones de este estudio, fue poco exitosa, ya que sólo logró 22% de fertilidad. Los resultados de este trabajo indicaron que a este nivel de fertilidad la inseminación artificial doble no es necesaria si a lo menos una de ellas se realiza en el medio del ciclo estral, y que la calificación de la mucosa y el mucus vagino-cervical son buenos indicadores para determinar el mejor momento para inseminar.

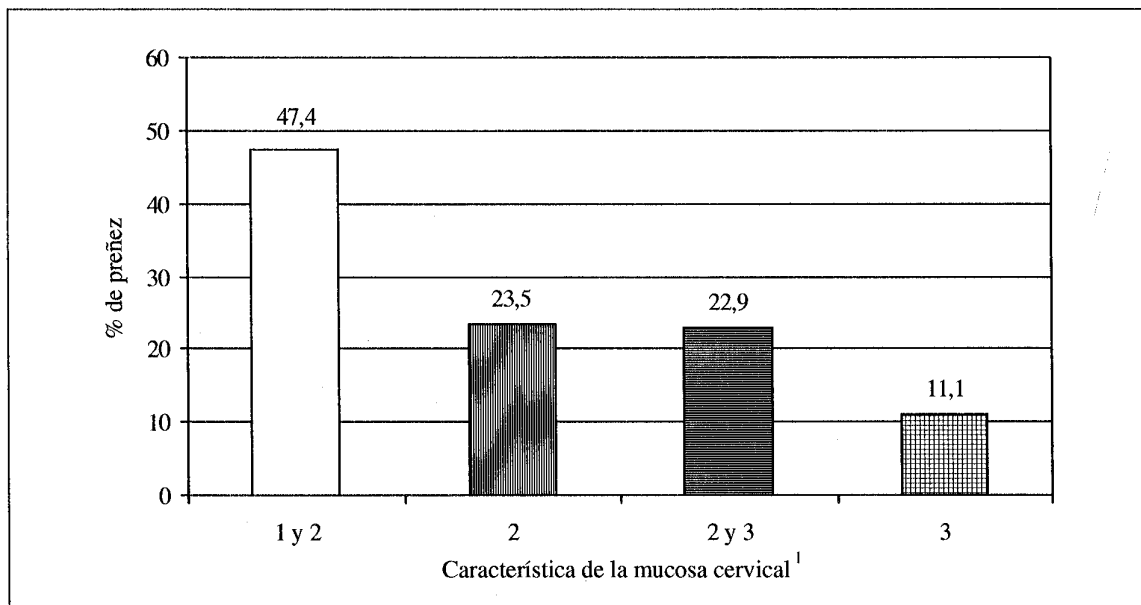


Figura 3. Fertilidad (porcentaje de preñez) resultante en relación con la característica de la mucosa cervical (1, 2 ó 3) al momento de realizar las IA intracervicales, tanto dobles como únicas, de ovejas Corriedale, utilizando semen congelado/descongelado. 1998.

Figure 3. Fertility (pregnancy percentage) resulting in relation with the cervical mucosal characteristics (1, 2 or 3) on performing AI, once or twice, for Corriedale ewes inseminated with frozen/thawed semen. 1998.

¹ 1: mucosa vaginal muy enrojecida con abundante mucus fluido, claro y filante.

2: mucosa vaginal enrojecida, fluido menos abundante, claro a lechoso.

3: mucosa vaginal poco enrojecida, fluido poco abundante, lechoso y espeso.

Las diferencias observadas no son significativas ($p < 0,10$).

LITERATURA CITADA

- Andersen, K., and J. Aamdal. 1972. Artificial insemination with frozen semen in sheep in Norway. *World Rev. Anim. Prod.* 8:77-79.
- Azzarini, M., y F. Valledor. 1998. Inseminación intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural. *Prod. Ovina* 1:1-8.
- Blank, O. 1998. Eficiencia de la inseminación artificial a distintos tiempos después de la detección de celo, en ovejas Corriedale de la Región de Magallanes. 62 p. Tesis Médico Veterinario. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile.
- De Lucia Silva, E. 1997. Inseminación con semen congelado, pedigrí y puro de origen. p. 28-30. Anuario 1997. Sociedad Criadores de Corriedale, Montevideo, Uruguay.
- Duran del Campo, A. 1993. Inseminación artificial. p. 43-45. Cap. 3. *In Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., Montevideo, Uruguay.
- Eppleston, J., and W.M.C. Maxwell. 1993. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix (review). *Wool Tech. Sheep Breed (Australia)* 41:291-302.
- Eppleston, J., S. Salamon, N. Moore, and G. Evans. 1994. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and the relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:211-225.
- Grøtte, O. 1995. Artificial insemination in goats and sheep in Norway. 7 p. The Norwegian Red Cattle Association, Hamar, Norway.
- Gustafsson, B. 1978. Aspects of fertility with frozen-thawed ram semen. *Cryobiology* 15:358-361.
- Jainudeen, M.R., and E.S.E. Hafez. 1987. Sheep and goats. p. 571-600. Chapter III. Reproductive cycles. *In* E.S.E. Hafez (ed.) *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Latorre V., E. 1998. Región de Magallanes. Nuevas biotecnologías de inseminación artificial ovina. *Tierra Adentro* Nº 19. p. 38-40.
- Latorre V., E. 2001. Intracervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. Fertility in Corriedale ewes under field conditions in the Chilean Patagonia. 42 p. International Master of Science Programme. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Uppsala, Sweden.
- Lightfoot, R.G., and S. Salamon. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method; transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewes. *J. Reprod. Fert. Dev.* 22:385-98.
- McDonald, M.F., G.K. Barrell, and Z.Z. Xu. 1998. Modifying reproductive processes. p. 77-90. Chapter V. *In* E.D. Fielden and J.F. Smith (eds.) *Reproductive management of grazing ruminants in New Zealand*. Occasional Publication Nº 12. New Zealand Society of Animal Production, Hamilton, New Zealand.
- Motulsky, H. 1995. *Intuitive Biostatistics*. 385 p. Oxford University Press, Inc. Oxford, UK.
- Olafsson, T. 1980. Insemination of sheep with frozen semen. Results obtained in a field trial in Norway. *Zuch Thg.* 15:50-59.
- Parraguez, V.H., O. Blank, C. Muñoz, y E. Latorre. 2000. Inseminación artificial en ovinos. *Mon. Med. Vet.* 20:69-77.
- Ritar, A.J., and P.D. Ball. 1993. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 31:249-262.

Rodríguez, F., H. Baldassarre, J. Simonetti, F. Aste, and J.L. Ruttle. 1998. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with aloe vera gel. *Theriogenology* 30:843-854.

Salamon, S., and W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reprod. Sci.* 38:1-36.

Smith J.F., and T.W. Knight. 1998. Reproductive management of sheep. p. 3-42. Chapter VII. *In* E.D. Fielden and J.F. Smith (eds.) *Reproductive management of grazing ruminants in New Zealand*. Occasional Publication N° 12. New Zealand Society of Animal Production, Hamilton, New Zealand.