

X
CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO DE
REPRODUCCIÓN E INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL EN GANADO OVINO Y CAPRINO

**Bases fisiológicas y características reproductivas de las
especies ovina y caprina**

Técnicas de inseminación artificial en la oveja

**Factores que influyen en los resultados de
inseminación**

**Selección y manejo de las ovejas sometidas a
inseminación artificial**

LUIS ANEL RODRIGUEZ*

MERCEDES ÁLVAREZ GARCÍA*

JUAN CARLOS BOIXO PÉREZ-HOLANDA**

*** Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal. Universidad de León.**

****CENSYRA de León. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León**

Granja Florencia 13,14 y 15 de abril de 2016.

**Bases fisiológicas y características reproductivas de las
especies ovina y caprina**

1.-FUNDAMENTOS DE ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN EL MACHO OVINO

Las gónadas masculinas o testículos están situadas fuera del abdomen, en el escroto, una bolsa con forma de saco derivada de la piel. Cada testículo descansa dentro del proceso vaginal, una extensión separada del peritoneo que pasa a través de la pared abdominal por el conducto inguinal, atravesando los anillos inguinales profundo y superficial. Los vasos sanguíneos y los nervios llegan al testículo junto con el cordón espermático. Los espermatozoides salen del testículo por los conductos excretorios, que llevan al conducto contorneado del epidídimo el cual se transforma enseguida en el conducto deferente recto.

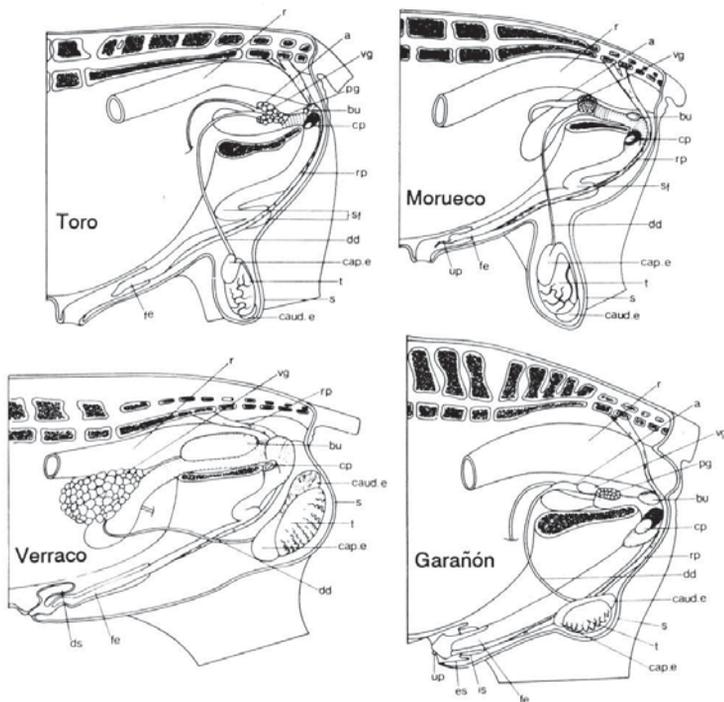


Fig. 1-1. Diagramas del aparato reproductor masculino visto en cortes laterales izquierdos. a, ampolla; bu, glándula bulbouretral; cap. e, cabeza del epidídimo; caud. e, cola del epidídimo; cp, pedúnculo izquierdo del pene, seccionado desde el isquion izquierdo; dd, conducto deferente; ds, divertículo dorsal del prepucio; es, prepucio prepeneano; fe, parte libre del pene; is, pliegue del prepucio; pg, próstata; r, recto; rp, músculo retractor del pene; s, escroto; sf, flexura sigmoidea; t, testículo; up, proceso uretral; vg, glándula vesicular. (Adaptado de Popesko [1968]. *Atlas der topographischen Anatomie der Haustiere*. Vol. 3, Jena, Fischer.)

Desarrollo y descenso de los testículos.

Los testículos se desarrollan en el interior del abdomen. Durante la vida fetal se produce el descenso de los testículos, que atraviesan la pared abdominal y el anillo inguinal, llegando hasta el escroto. En el cuadro 1-1 se resumen algunos cambios anatómicos importantes que ocurren en el desarrollo postnatal.

Cuadro 1-1. Cronología del desarrollo del aparato reproductor masculino en animales domésticos

	Toro	Morueco	Verraco	Garañón
Descenso testicular	Entra hasta la mitad del escroto durante la vida fetal	Entra hasta la mitad del escroto durante la vida fetal	Entra en el escroto durante el último cuarto de la vida fetal	Entra en el escroto poco antes o después del nacimiento
EspERMATOCITOS primarios en los túbulos seminíferos	24 semanas	12 semanas	10 semanas	Variable a lo largo de los túbulos seminíferos de cada testículo
EspERMATOCITOS en los túbulos seminíferos	32 semanas	16 semanas	20 semanas	56 semanas (variable)
EspERMATOCITOS en la cola del epidídimo	40 semanas	16 semanas	20 semanas	60 semanas (variable)
EspERMATOCITOS en el semen eyaculado	42 semanas	18 semanas	22 semanas	64 a 96 semanas
Separación completa entre el pene y la porción penéana del prepucio	32 semanas	>10 semanas	20 semanas	4 semanas
Edad a la que el animal puede considerarse sexualmente "maduro"	150 semanas	>24 semanas	30 semanas	90 a 150 semanas (variable)

Algunas veces los testículos no entran en el escroto, lo cual recibe el nombre de **criptorquidia**, que cuando es bilateral produce esterilidad, aunque se mantenga el impulso sexual. En ocasiones, alguna víscera abdominal puede atravesar el conducto inguinal y entrar en el escroto, lo que se denomina hernia escrotal, que es particularmente común en cerdos. Después del nacimiento el aparato reproductor crece en mayor proporción que el resto del cuerpo, pero no todos sus componentes adquieren funcionalidad simultáneamente. Así, en el toro la capacidad de erección precede en varios meses a la presencia de espermatozoides en el eyaculado. El momento en el aparato reproductor adquiere funcionalidad se denomina **pubertad**, y el período de rápido desarrollo anterior a ésta se denomina **período prepuberal**. Durante el **período postpuberal** el desarrollo continúa hasta alcanzar la completa madurez sexual meses o incluso años después de la pubertad.

Testículo y escroto

El testículo está unido a la pared interna del escroto a lo largo de la línea de su unión con el epidídimo. Su posición en el escroto y la orientación de su eje mayor difieren con la especie (fig. 1-1).

En la figura 1-3 pueden observarse las estructuras testiculares. En el interior del testículo se encuentran los **túbulos seminíferos**, donde se forman los espermatozoides y donde se secretan las hormonas masculinas. La castración de machos

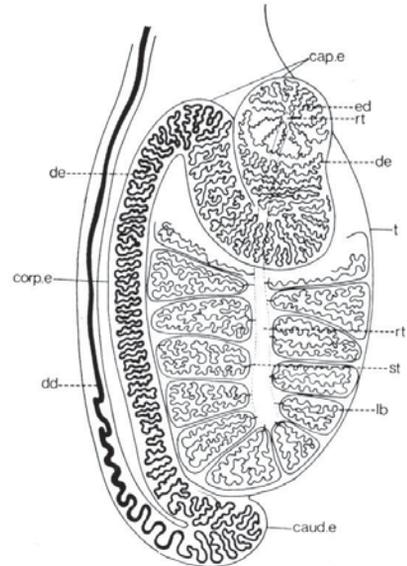


Fig. 1-3. Dibujo esquemático del sistema tubular de testículo y epidídimo en el toro (por claridad se omite el sistema de conductos de la red testicular). *cap. e*, cabeza del epidídimo; *caud. e*, cola del epidídimo; *corp. e*, cuerpo del epidídimo; *dd*, conducto deferente; *de*, conducto del epidídimo; *ed*, conducto eferente (conducto excretor del testículo); *lb*, lóbulo con túbulos seminíferos; *rt*, red testicular (o de Haller); *st*, túbulo recto; *t*, testículo. (Simplificado de Blom y Christensen [1960]. *Nord. Vet. Med.* 12, 453.)

prepuberales suprime el desarrollo sexual y si se hace en machos adultos modifica el comportamiento agresivo de los machos y elimina características indeseables de su carne (por ejemplo el sabor de la carne de verraco).

La producción diaria de espermatozoides varía con la especie, pero es de unos 15 a 30 millones por gramo de tejido testicular, aumenta con la edad en el período postpuberal y está sujeta a cambios estacionales en muchas especies.

El proceso de formación de los espermatozoides a partir de las células precursoras existentes en el testículo (espermatogonias) recibe el nombre de espermatogénesis. El proceso completo se efectúa aproximadamente en 7 semanas (49 días) en los carneros, aunque aparentemente se requieren 7 a 10 días adicionales en los toros. Por este motivo, los procesos que afectan negativamente a la producción o calidad espermática como enfermedades, altas temperaturas ambientales, etc. manifiestan su efecto en los eyaculados recogidos unos dos meses después.

El tamaño testicular varía durante el año en las especies con temporada reproductiva (morueco). La extirpación de un testículo causa un aumento considerable de tamaño en el otro (hasta un 80% de incremento en el peso).

Termorregulación de los testículos.

Para funcionar correctamente los testículos deben mantenerse a una temperatura menor que la del resto del cuerpo. Determinadas características anatómicas del testículo y escroto permiten la regulación de la temperatura testicular. En la piel escrotal hay ausencia de grasa, abundancia de glándulas sudoríparas y un componente muscular (túnica dartos) que le permite modificar el espesor y el área superficial del escroto, y variar la cercanía del contacto de los testículos con la pared corporal. En el caballo, esta acción es auxiliada por el músculo del cordón espermático (cremáster), el cual puede elevar o bajar los testículos. En tiempo frío estos músculos se contraen, de manera que elevan los testículos y arrugan y engosan la pared escrotal. En tiempo cálido los músculos se relajan, para así bajar los testículos en el escroto, el cual queda distendido y con la pared delgada. A las ventajas de estos mecanismos se suma el íntimo contacto entre las venas testiculares que forman el plexo pampiniforme y la arteria testicular con estructura contorneada, de forma que la sangre arterial que entra en los testículos es enfriada (4° C en los moruecos) por la sangre venosa que sale de ellos (fig. 1-2). Períodos relativamente cortos de temperatura y humedad ambiental elevadas pueden causar aumentos significativos en la proporción de espermatozoides anormales en el semen eyaculado de toros, moruecos y verracos. Por este mismo motivo los criptóquidos bilaterales son estériles.

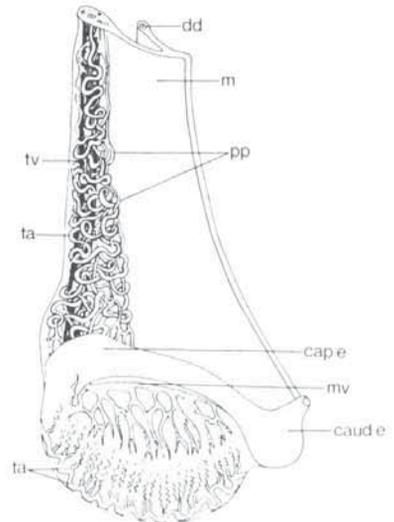


Fig. 1-2. Vista esquemática lateral del testículo izquierdo de un garrañón, en la que se muestra la disposición de arterias y venas. cap. e, cabeza del epidídimo; caud. e, cola del epidídimo; dd, conducto deferente; m, mesorquio; mv, vena marginal del testículo; pp, plexo venoso pampiniforme; ta, arteria testicular; tv, vena testicular. (Adaptado de Tagand y Barone [1956]. *Anatomie des Equidés Domestiques*, 2, iii, Lyons, Ecole Nat. Vet.)

Epidídimo y conducto deferente.

Se reconocen tres regiones anatómicas en el epidídimo (fig. 1-3). Comienza en la cabeza, en la que una cantidad variable de conductos excretorios del testículo (13 a 20) se unen al conducto epididimario; continúa en el estrecho cuerpo y termina en el otro extremo del testículo en la cola del epidídimo, observable a simple vista en el animal vivo. Durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo, que requiere de 9 a 13 días, se produce la maduración espermática. La cola del epidídimo tiene la capacidad de almacenar espermatozoides durante varias semanas manteniendo su capacidad fecundante, y es el principal sitio de almacenamiento de los espermatozoides dentro del aparato reproductor masculino, conteniendo el 70% de los espermatozoides producidos, mientras que el conducto deferente sólo contiene un 2%. Parte de los espermatozoides no eyaculados se eliminan por la orina y el resto envejecen y se desintegran.

Glándulas accesorias.

La próstata y las glándulas vesiculares y bulbouretrales vierten sus secreciones en la uretra donde, en el momento de la eyaculación, se mezclan con la suspensión de espermatozoides y secreciones de la ampolla del conducto deferente. Estas secreciones aportan un medio líquido nutritivo para el transporte de los espermatozoides, aunque éstos son fecundantes cuando se obtienen de la cola del epidídimo y se emplean para inseminar sin agregar las secreciones de las glándulas accesorias. La fracción gelatinosa del semen eyaculado del verraco forma un tapón en la vagina de las hembras con las que se ha apareado. En la figura 7-11 se representa esquemáticamente la contribución de las glándulas accesorias a la producción del semen.

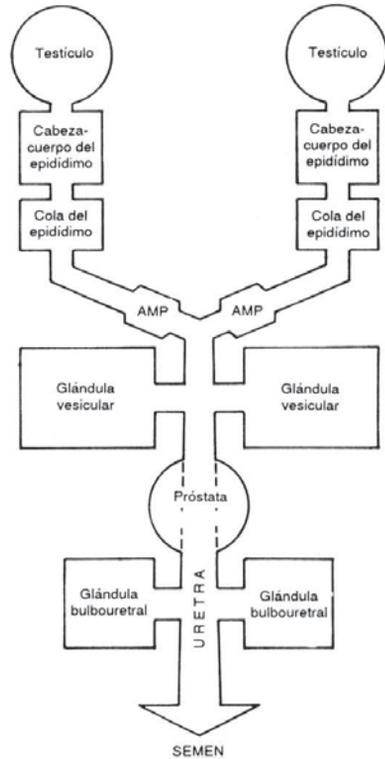


Fig. 7-11. En la mayor parte de los animales domésticos, el semen eyaculado contiene, además de una pequeña cantidad de líquido testicular, aportaciones de varios órganos accesorios incluyendo epidídimo (cabeza-cuerpo y cola), glándulas ampulares (AMP), glándulas vesiculares, próstata y glándulas bulbouretrales. La contribución relativa de las glándulas varía no sólo con la especie sino también de un individuo a otro de la misma especie y de una eyaculación a otra del mismo animal.

Pene y prepucio.

El pene de los mamíferos tiene tres cuerpos cavernosos que se agrupan alrededor de la uretra. Los toros, los cerdos y los moruecos tienen una flexura sigmoide, una curva en forma de S en el pene, lo que permite que se retraiga por completo, y estas tres especies junto con el garañón tienen músculos retractores del pene, un par de músculos que se relajan para permitir la extensión del pene y se contraen para retirar el pene hacia el cuerpo. En algunas especies los tejidos subcutáneos de la parte libre del pene forman un cuerpo cavernoso bien desarrollado, el cuerpo esponjoso del glande, que es el cuerpo eréctil del glande peneano. Es grande en el garañón, poco desarrollado en el toro e indistinto en el verraco (fig. 3-7).

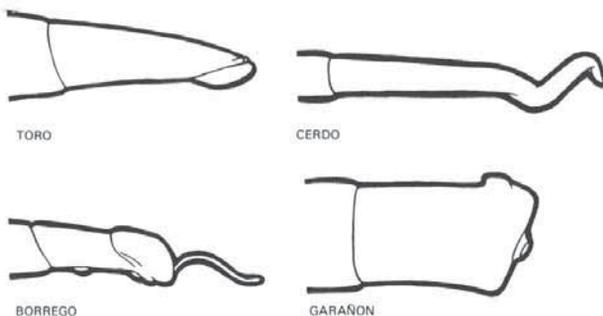


Fig. 3-7. Diagramas comparativos que muestran la forma del glande del toro, cerdo, borrego y garañón. (Redibujado de Ashdown y Hancock, 1974. *Reproduction in Farm Animals* [3rd. ed.] ed. Hafez. Lea y Febiger).

Erección.

La estimulación sexual produce dilatación de las arterias que riegan los cuerpos cavernosos del pene, de forma que la erección es el resultado de la acumulación de sangre en tales espacios, junto con la acción de determinados músculos peneanos. El pene del semental equino tiene grandes áreas cavernosas que explican el incremento de tamaño del pene durante la erección. En el toro, carnero y verraco la erección resulta de una extensión del pene, con poco incremento en el tamaño. Estos animales tienen penes fibroelásticos con pequeñas áreas de tejido cavernoso. En la figura 10-9 se describe la estructura del pene con y sin erección en estas especies.

Eyacuación.

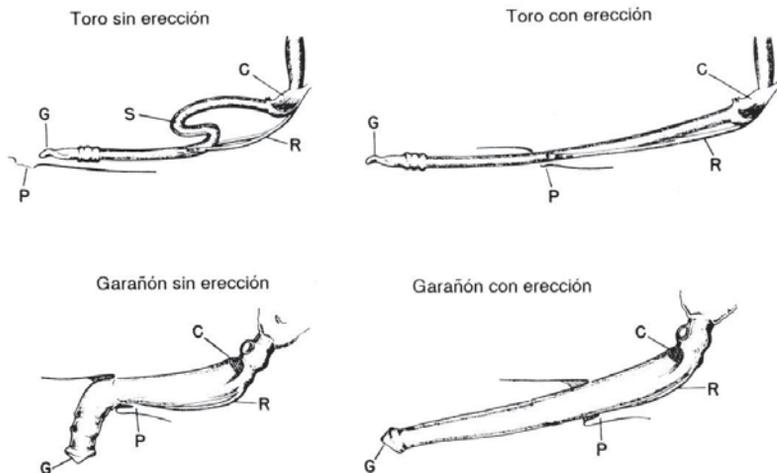


Fig. 10-9. Esquema de la anatomía de un pene tipo fibroelástico (toro) y uno tipo vascular-muscular (garañón) en estado flácido (no erecto) y erecto. La anatomía del pene determina en gran medida las respuestas eyaculatorias de la especie. C, músculo cavernoso; G, glande; P, prepucio; R, retractor del músculo peneano; S, flexura sigmoidea.

La eyacuación consiste en la salida de semen empujado por una serie de contracciones peristálticas en los conductos seminales. El eyaculado incluye espermatozoides procedentes de

las ampollas de los conductos deferentes y del epidídimo, y líquidos de las glándulas accesorias. La eyaculación varía entre las especies en varios aspectos (Cuadro 11-1).

Cuadro 11-1. Características del eyaculado promedio para diferentes especies

Especies	Tiempo de Eyaculado	Volumen (ml)	Concentración
Toro	Menos de un seg	7	1,200 millones/ml
Borrego	Menos de un seg	1.5	2,000 millones/ml
Verraco	10—20 minutos	300	200 millones/ml
Garañón	10—15 seg	75	150 millones/ml

En los toros y carneros la eyaculación ocurre casi inmediatamente después de la introducción del pene, mientras que en el semental equino es de 10 a 15 segundos, y en los cerdos varios minutos (hasta 10 o 20). En los verracos la eyaculación es fraccionada, de forma que hay una primera fracción pobre en espermatozoides, después una rica y al final otra pobre. En la recogida de semen para inseminación se intenta recoger sólo la fracción rica.

Mantenimiento de la libido.

En el mantenimiento de la libido (deseo sexual) intervienen muchos factores. La **alimentación** ha sido estudiada especialmente en los toros, comprobando que tanto la subalimentación en animales jóvenes como la sobrealimentación en animales maduros reducen la libido. Si los toros adultos están pasados de peso aumentarán los problemas de pezuñas, patas y articulaciones, lo que puede reducir su vida reproductiva. Las **enfermedades y lesiones** reducen la libido, incluso problemas aparentemente menores como una articulación inflamada o una infección respiratoria leve. Deben cuidarse especialmente las pezuñas. Un problema que se ha encontrado en centros de inseminación es la **saciedad sexual**, debida a que la recogida seminal se hace repetitiva. Para evitar este problema puede ser adecuado cambiar al animal que es montado por un segundo o desplazarse a otra zona de recogida. Si hay dolor o condiciones que hagan desagradable la cópula o la recogida de semen el animal puede rechazar la actividad sexual. Por este motivo tener el agua de la vagina artificial muy fría o muy caliente, doblar excesivamente el pene o agarrarlo será desagradable para el semental, que puede negarse en posteriores intentos de recogida.

Semen y espermatozoides.

El **semen** es la suspensión celular líquida o semigelatinosa que contiene los gametos masculinos, los espermatozoides, y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión, que se forma durante la eyaculación, se conoce como **plasma seminal**. Los espermatozoides (fig. 7-2) se forman dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular. Los espermatozoides son especialmente sensibles a cambios térmicos bruscos (choque térmico). Por este motivo debe evitarse recoger el semen sobre un colector frío, ya que los

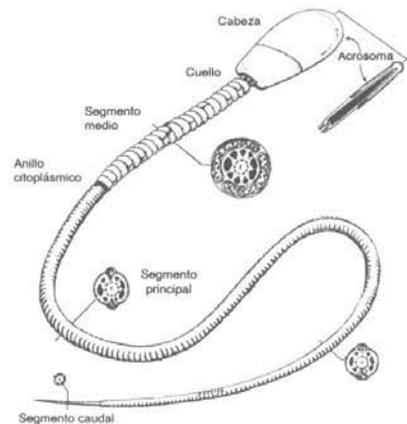


Fig. 7-2. Características de un espermatozoide de bovino. Se observan la cabeza, con su casquete acrosómico y la cola, con sus cuatro divisiones anatómicas. Cortes transversales del segmento medio, el segmento principal (2) y el segmento caudal muestran el núcleo axonémico central con 9 + 2 microtúbulos, las nueve fibras externas gruesas, la vaina mitocondrial, las columnas longitudinales dorsal y ventral, y las costillas circunferenciales.

espermatozoides recogidos sufren una modificación de su estructura y alteran sus parámetros de movilidad de forma irreversible, por lo cual no es posible utilizar dicho semen para la elaboración de dosis seminales.

Incapacidad reproductiva en machos.

La fecundidad en el macho depende de varios factores como son la producción de espermatozoides, la viabilidad y capacidad fecundante de dichos gametos, el deseo sexual o la capacidad de aparearse.

Determinadas **malformaciones congénitas** como la **criptorquidia** bilateral producen esterilidad debida a la supresión térmica de la espermatogénesis, mientras que en los casos unilaterales ocurre la espermatogénesis normal en el testículo escrotal. Este problema se presenta sobre todo en cerdos y caballos y es hereditario. La **hipoplasia testicular** o falta de desarrollo del epitelio espermatógeno puede sospecharse al observar el menor tamaño de los testículos.

Algunos **trastornos eyaculatorios** como la **ausencia de libido** hereditaria o adquirida, la **incapacidad de copular** por diversas formas de invalidez física para la monta, penetración o eyaculación también producen incapacidad reproductiva.

La incapacidad para montar por problemas locomotrices (dislocaciones, fracturas, esguinces, lesiones articulares, etc.) es bastante frecuente.

La incapacidad para la penetración puede presentarse por diversos motivos como la fimosis (estrechamiento del orificio prepucial, que puede ser congénita o adquirida por traumatismo o infección), hematoma del pene por rotura del cuerpo cavernoso, tumores, deformidades congénitas del pene, etc (fig 12-2).

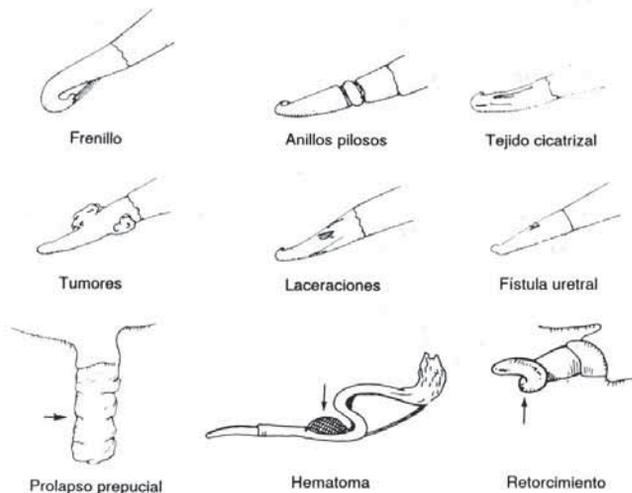


Fig. 12-2. Anormalidades congénitas y adquiridas de pene y prepucio del toro que interfieren en la penetración y causan bajas tasas de concepción. (Dos filas superiores redibujadas de Sorensen, A.M. [1979]. En *Animal Reproduction: Principles and Practice*, Nueva York, McGraw-Hill.)

2.-ANATOMÍA DEL APARATO GENITAL DE LA OVEJA

El útero en los rumiantes se denomina *bipartitus* ya que la fusión de los cuernos no es completa y la tabicación en el interior del órgano es más extensa de lo que aparenta exteriormente, por esta presencia del velo uterino reciben el apelativo de úteros *bipartitus* o *subseptus*.

El útero de la oveja se caracteriza por poseer unos cuernos muy largos (12 a 15 cm), dispuestos en espiral, que sólo presentan un ligamento intercornual, un cuerpo muy pequeño (2 a 3 cm) y un cuello de gran entidad anatómica (4 cm o más).

Las paredes del cuello, rígidas y con tejido escleroso en los períodos de reposo, delimitan un canal cervical irregular, estrecho y anfractuoso, ocluido por “bordes” transversales o espirales. Estos pliegues prominentes, llamados anillos, presentan diferencias en su disposición, altura y complejidad según la especie, y están especialmente desarrollados en la oveja. El tamaño del cuello también depende de la edad de la hembra y del número de partos.

El cérvix ovino es una estructura con una gruesa pared que se proyecta caudalmente en la vagina (Wand, 1968). Su consistencia particularmente rígida y su longitud hacen que sea considerado como un esfínter de la cavidad uterina. Este esfínter consta, en su mayoría, de tejido conjuntivo fibroso y de tejido muscular. Las propiedades del tejido conjuntivo dependen del tipo, concentración e interacciones de las moléculas que componen la matriz extracelular, por ello, las características funcionales de este órgano se alteran en forma notoria con los cambios de estos parámetros.

Vascularización del útero

La irrigación del útero y del todo el aparato genital se caracteriza por tener grandes fluctuaciones en el volumen de sangre circulante según esté en reposo genital o en períodos de actividad (celo, gestación). No todas las arterias que intervienen en el riego de los órganos genitales femeninos -la ovárica, la uterina, la vaginal y la pudenda interna- proceden del mismo tronco en las distintas especies domésticas. Existen tres arterias mayoritariamente involucradas en la vascularización del útero:

- Rama uterina de la arteria ovárica
- Arteria uterina media
- Rama uterina de la arteria vaginal

La arteria ovárica siempre procede de la aorta abdominal, inmediatamente craneal a la mesentérica caudal, es homóloga de la arteria testicular del macho. Se la ha denominado “arteria uterovárica” porque emite una rama uterina para la porción craneal de los cuernos aunque también emite una rama tubárica para las trompas. Esta arteria discurre a nivel de los músculos lumbares sujeta por el pliegue seroso al techo del abdomen y se dirige al mesoovario donde da la rama uterina; en rumiantes realmente existen varios ramos uterinos que se anastomosan con la arteria uterina a nivel del mesometrio (Del Campo y Ginther, 1973, 1974a, 1974b). La arteria uterina o uterina media nace de la arteria umbilical y a su vez ésta procede de la arteria iliaca interna, camina por el ligamento ancho, desciende por el mesometrio y se divide en varios ramos cuya distribución varía con las especies. En la oveja se anastomosan cranealmente con ramos uterinos de la arteria ovárica y caudalmente con ramos uterinos de la arteria vaginal. Esta arteria irriga la porción del útero en que se desarrollará el feto por lo que aumenta su diámetro a medida que progresa la gestación (Frandsen, 1974) haciéndose palpable en la vaca por vía rectal.

La arteria vaginal es análoga a la arteria prostática en el macho. Llega a la vagina y emite una rama uterina que recorre las paredes laterales del cuello y la vagina. Emite pequeñas ramas que penetran en el interior del cérvix.

Las venas del útero constituyen redes similares a las de las arterias pero más anastomosadas. Se reúnen con las arterias a ambos lados del parametrio en un fuerte plexo, de donde proceden las raíces de la vena uterina y de las ramas uterinas de las venas ovárica y vaginal. En el ligamento ancho estas venas son satélites de las arterias homólogas, pero no

siempre presentan una importancia proporcional a ellas. En los rumiantes, la vena uterina tiene menor importancia que las venas ovárica y vaginal. La vena ovárica en la oveja (Del Campo y Ginther., 1973; Ginther y Del Campo, 1974) o vena uteroovárica es un gran tronco común al cual drenan el ovario, el oviducto y gran parte del útero. El cuerpo uterino y el cérvix son drenados por la rama uterina de la vena vaginal, la cual también se anastomosa con ramas de la rama uterina de la vena ovárica (vena uterina principal). La relación histológica entre la vena uteroovárica y la arteria ovárica de la oveja ha sido estudiada por diversos autores (Del Campo y Ginther, 1973, 1974) quienes observan que existen áreas en las cuales las paredes de los dos vasos están completamente superpuestas lo que puede favorecer la comunicación fisiológica de ambas estructuras.

Los capilares linfáticos son numerosos y forman una red en la pared del útero que se desarrolla mucho durante la gestación. Son difíciles de evidenciar en la mucosa pero se reúnen en las proximidades del miometrio, cuyo estrato vascular da una red más importante que comunica con el plexo subseroso. El conjunto es drenado por varios colectores que pasan por los ligamentos anchos. El útero no posee ningún nódulo linfático propio. Los vasos de la mitad craneal del útero drenan directamente a los nódulos linfáticos lumbo-aórticos y los de la mitad caudal a los nódulos ilíacos mediales e hipogástricos y a los sacros.

Inervación del útero

La inervación del aparato genital femenino deriva fundamentalmente de los plexos mesentéricos posteriores, que se forman con las terminaciones nerviosas que derivan de la región lumbar, de algunas dorsales y de las primeras sacras, y por el plexo hipogástrico integrado por las últimas derivaciones de la región lumbar, sacra y primeras coxígeas. El plexo hipogástrico se relaciona con el plexo mesentérico a través del plexo lumbosacro que comunica ambos y coordina las respuestas nerviosas. Además, estos plexos hacen recambio en el plexo ovárico y llegan a los ganglios pelvianos acompañando, la mayoría de las veces, a los trayectos vasculares. En estos ganglios pelvianos se mezclan las fibras simpáticas mesentéricas e hipogástricas con las fibras parasimpáticas que vienen de los nervios pudendos y rectales caudales. Desde aquí, la mayor parte pasan al plexo uterino acompañando a los vasos de igual nombre, y la otra parte acompaña al ramo uterino de la arteria vaginal.

El plexo uterino se encuentra situado sobre la pared uterina y sobre el conducto cervical. En la vagina existe un “plexo paravaginarum” que define el tono vaginal, además en el epitelio vaginal existen numerosos corpúsculos receptores sensitivos que recogen sensaciones de carácter mecánico, térmico y táctil. Todas estas fibras son amielínicas, o están muy poco mielinizadas, y se distribuyen en el miometrio y endometrio, donde no existen células nerviosas. Aunque la mayor parte están destinadas a la capa muscular, las que van a la mucosa se colocan alrededor de las glándulas llegando al epitelio superficial. En el útero existe un pequeño número de fibras sensitivas cuya función no es perfectamente conocida y, en todo caso, parece ser muy variable e influenciado por el sistema hormonal. A pesar de lo descrito con anterioridad, se ha demostrado que el útero denervado es capaz por sí mismo de coordinar las contracciones y de producir los fenómenos mecánicos de un parto normal.

3.-PARTICULARIDADES REPRODUCTIVAS DE LA ESPECIE OVINA

Uno de los rasgos más característicos de reproducción ovina, aunque no es exclusivo de esta especie, es la estacionalidad. La reproducción en la especie ovina, en las regiones templadas de nuestra latitud, tiene un carácter estacional relacionado con el fotoperíodo (evolución diaria de la duración y de la intensidad de luz) que marca la alternancia de dos periodos: periodo de anestro, generalmente durante la primavera y el verano, y

periodo de actividad sexual en otoño e invierno (Thimonier y Mauléon, 1969; Ortavant et al., 1985; Thimonier, 1996; Malpoux et al., 1996; Chemineau et al., 1996). Los «días cortos», en los cuales el fotoperíodo es decreciente, son estimuladores de la actividad sexual y los «días largos» son inhibidores. Dentro de las especies de «días cortos», los ovinos y los caprinos son los más sensibles al fotoperíodo, mientras que los porcinos manifiestan respuestas más ligeras a los cambios de la duración del día (Chemineau, 1992).

La percepción del fotoperíodo se hace a través de la secreción de la melatonina, sustancia natural sintetizada en la glándula pineal, que es el mensajero bioquímico del sistema neuroendocrino de los animales para medir la duración del día. La melatonina está secretada durante la fase oscura y según la duración de esta última los animales perciben la duración de la noche y en consecuencia la del día. Una larga duración de la secreción de melatonina se interpreta como un día corto, y provoca la estimulación de la actividad ovárica en las especies de días cortos (Bittman et al., 1983; Karsch et al., 1984; Chemineau et al., 1996; Lalot et al., 1998).

Aunque los machos son capaces de cubrir durante todo el año, fuera de la estación reproductiva se registra una falta de libido y una disminución en la producción y la calidad espermática, proporcionando disminuciones relativamente importantes en cuanto a la fertilidad y la prolificidad del ganado (Thimonier, 1989). Así, en el morueco Île-de-France, la producción de espermatozoides diaria por testículo pasa de alrededor de 1.000 millones en primavera a 5.000 millones en otoño (Dacheux et al., 1981). La calidad del semen y su fertilidad en inseminación artificial varían también, en efecto, en la misma raza se ha observado que el porcentaje de espermatozoides anormales es de más del 20% con una fertilidad del 47,1% en primavera, mientras en otoño estos valores pasan al 10% y al 68,4%, respectivamente (Colas, 1980).

La estacionalidad tiende a desaparecer en las razas que habitan más cerca del ecuador, donde no existen cambios marcados de la duración del día, y la actividad reproductiva puede ocurrir en cualquier momento del año. En las ovejas originarias y criadas en los países de la cuenca del Mediterráneo, la duración del anestro estacional es mucho menor que en las de países de Europa del Norte. Así, en los países Mediterráneos la duración del anestro varía entre 51 y 123 días (51 días para Raza Tadmit en Argelia (Ammar-Khodja y Brudieux, 1982), 91 días para la raza Rasa Aragonesa en España (Abecia, 1992) y 123 días para la raza Barbarina en Túnez (Khaldi, 1984)), en cambio, en Europa del Norte la duración del anestro estacional es mucho mayor (219 días para la raza Île-de-France; Thimonier y Mauléon (1969); Chemineau (1992)). En algunas zonas tropicales, la estacionalidad ha desaparecido completamente como el caso de la raza Cróele (0 días de anestro; Mahieu et al., 1989).

4.-CARACTERÍSTICAS MORFO-ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL CUELLO UTERINO

4.1.-ANATOMÍA DEL CÉRVIX OVINO

El cérvix, llamado también cuello uterino, es un órgano de estructura similar a un esfínter que conecta la parte caudal del útero con la vagina (Wand, 1968) y que está relacionado dorsalmente con la ampolla rectal y ventralmente con la vejiga urinaria. El cuello uterino es un órgano fibroso constituido básicamente por tejidos conjuntivos con poca presencia de tejido muscular liso. La pared del cérvix es gruesa y con una estrecha

luz cervical interna marcada por la presencia de varias prominencias transversales cuyos bordes están cerrados en forma de espiral y se conocen como anillos o pliegues cervicales (Hafez, 1996a; Álvarez, 2000). El número, el grado de desarrollo y la posición de estos anillos son variables según la especie.

En la oveja, el cérvix fue detallado por Sisson en 1947 (citado por DUN, 1955) que lo describe como un tubo fibroso cuya luz está obstruida por prominencias y depresiones de la membrana de la mucosa que forman los pliegues anulares o anillos cuyo número está entre 4 y 5 (Dun, 1955). El cérvix ovino ha sido considerado por Sorensen (1979) como una versión en miniatura del cérvix vacuno y la mayoría de los tratados de reproducción (McDonald, 1969, Hafez, 1996a) utilizan ilustraciones diagramáticas y esquemáticas del cérvix vacuno para representar en general el cérvix de los rumiantes aunque, en realidad, existen muchas diferencias estructurales entre las distintas especies.

El cérvix vacuno tiene una longitud entre 8 y 10 cm y una anchura externa entre 3 y 4 cm (Hafez, 1996a), mientras que el de ovino tiene una longitud más variable oscilando entre 4 y 9 cm, marcada por la presencia de muchos anillos (entre 4 y 6) y con una anchura externa entre 1 y 2 cm (Wand, 1968; Barone, 1978; Veksler-Hess et al., 1992; Souza et al., 1994b; Hafez, 1996a; Álvarez, 2000). Considerando la relación longitud/anchura y el tamaño del animal, el cuello uterino, desde un punto de vista anatómico, es más largo en la oveja que en la vaca. Además de estas características, la falta de alineación de los numerosos anillos cervicales en la pequeña luz interna presta al cuello uterino de la oveja una estructura compleja infranqueable por los instrumentos de inseminación (Wand, 1968, Barone, 1978; Halbert et al., 1990a; Eppleston et al., 1994; Álvarez, 2000).

Estas pequeñas diferencias anatómicas y estructurales entre el cuello uterino de la oveja y los de otras especies son suficientes para considerar que el cérvix de la oveja es un órgano de estructura muy compleja que requiere estudios específicos y precisos para mejorar las técnicas de reproducción asistida.

Los datos morfométricos del cuello uterino ovino varían en función de la raza y la edad. Las variaciones raciales en la morfometría del cérvix pueden ser, en parte, la explicación de la variabilidad de los resultados de fertilidad de la inseminación artificial entre razas. En la raza Lacaune, Moré (1984) encuentra una longitud media de 5,5 cm con la presencia de 6 anillos. En la raza Suffolk, Halbert et al. (1990a) encuentran una longitud media del cérvix de 6,6 cm y un número medio de anillos de 4,8, mientras que en la raza Cheviot encuentran valores morfométricos más altos, siendo 7,3 cm y 5,6 respectivamente para la longitud y el número de anillos. En la raza Churra, Álvarez (2000) encuentra una longitud media de 6,19 cm y un número medio de anillos de 4,35.

Fukui y Roberts (1978) aportaron valores ligeramente superiores para la raza Merina encontrando una longitud media de 6,54 cm con un promedio de anillos cervicales de 5,8. En cambio, en la misma raza, Eppleston et al. (1994) encontraron una longitud de 4,87 cm y un número de anillos de 3,97. Aunque puede existir una variabilidad individual en la morfometría del cérvix, los valores presentados por Eppleston et al. (1994) son muy inferiores a los presentados por Fukui y Roberts (1978) y a los encontrados en el presente trabajo para la raza Merina. La subjetividad en la determinación de las medidas del cuello uterino puede ser el factor de variación más importante. En efecto, el canal cervical está mal delimitado en su parte craneal que es un estrechamiento del cuerpo uterino marcado por la presencia de pequeñas depresiones que determinan la transición entre las dos partes. Las medidas del cuello uterino

aumentan en función de la edad de la hembra. En este sentido, Eppleston et al. (1994), comparando cuellos uterinos de corderas y ovejas Merinas, encuentran que la longitud, las distancias entre anillos, el diámetro interno y las alturas de los dos primeros anillos son significativamente superiores ($P < 0,01$) en las ovejas que en las corderas (Tabla 1).

Tabla 1. Variación de las medidas del cuello uterino y de la penetración cervical (Media \pm ES) en la raza Merina en función de la edad (Eppleston et al., 1994).

Medida	Corderas	Ovejas
Longitud (cm)	3,69 \pm 0,11 ^a	4,87 \pm 0,10 ^b
Número de anillos	4,21 \pm 0,13 ^a	3,97 \pm 0,13 ^a
Distancia al 1er anillo (cm)	0,90 \pm 0,06 ^a	1,27 \pm 0,61 ^b
Distancia al 2º anillo (cm)	1,59 \pm 0,08 ^a	2,17 \pm 0,08 ^b
Distancia al 3º anillo (cm)	2,18 \pm 0,09 ^a	3,00 \pm 0,08 ^b
Distancia al 4º anillo (cm)	2,86 \pm 0,11 ^a	3,69 \pm 0,11 ^b
Distancia al 5º anillo (cm)	3,20 \pm 0,17 ^a	4,56 \pm 0,20 ^b
Diámetro interior (cm)	0,53 \pm 0,02 ^a	0,65 \pm 0,02 ^b
Altura del 1er anillo (cm)	0,73 \pm 0,04 ^a	1,03 \pm 0,03 ^b
Altura del 2º anillo (cm)	0,72 \pm 0,04 ^a	0,97 \pm 0,04 ^b
Penetración del catéter estándar (cm)	1,13 \pm 0,15 ^a	1,47 \pm 0,13 ^b
Penetración del catéter helicoidal (cm)	0,96 \pm 0,13 ^a	1,60 \pm 0,12 ^b

Distintos superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0,01$)

Respecto al número de anillos cervicales, los mismos autores registraron una disminución, aunque no fue significativa, en función de la edad (4,21 vs 3,97 para corderas y ovejas múltiparas, respectivamente). Según Dun (1955), las variaciones de las medidas morfométricas del cuello uterino en función de la edad se deben en parte a los partos en los cuales se dilata el cérvix y se rompen los anillos.

Aunque se diferencien mucho en la longitud del cuello uterino y la altura de los dos primeros anillos, los resultados de las medidas internas del cérvix presentados por Eppleston et al. (1994) son similares a los aportados Álvarez (2000) en la oveja Churra (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas básicas del cuello uterino de la raza Churra (Álvarez, 2000).

Medida	Media \pm es
Longitud (cm)	6,19 \pm 0,89
Anchura externa (cm)	1,11 \pm 0,31
Número de anillos	4,35 \pm 0,92
Distancia al 1 ^{er} anillo (cm)	1,13 \pm 0,05
Distancia al 2º anillo (cm)	2,07 \pm 0,06
Distancia al 3º anillo (cm)	2,90 \pm 0,07
Distancia al 4º anillo (cm)	3,81 \pm 0,10
Altura del 1 ^{er} anillo (cm)	0,49 \pm 0,03
Altura del 2º anillo (cm)	0,47 \pm 0,02
Anchura del punto más estrecho (cm)	0,20 \pm 0,07
Anillo más excéntrico	2,01 \pm 0,48

En el cérvix ovino, generalmente el segundo pliegue se encuentra desalineado respecto a las posiciones del primero y del tercero (Bunch y Ellsworth, 1981; Moré, 1984; Trejo y Corona, 1987; Álvarez, 2000), por tanto, el avance de un instrumento recto como el catéter de inseminación dentro el canal cervical se encontraría frenado por la cavidad ciega formada por el segundo pliegue. En la cabra, los pliegues o anillos cervicales son más numerosos (de 6 a 8) que en la oveja pero están mejor alineados (Barone, 1978). En la oveja, los pliegues cervicales se fijan tan estrechamente que sólo dejan una luz muy pequeña y tortuosa prácticamente impenetrable con la pipeta recta de inseminación. Sin embargo, en la cabra la luz cervical es mucho mayor, sobre todo en el periodo del estro, dejando pasar perfectamente la pipeta de inseminación en el 30-50% de los animales (Evans y Maxwell, 1990b).

En la mayoría de los estudios realizados, el anillo más excéntrico suele ser el segundo (Bunch y Ellsworth, 1981; Trejo y Corona, 1987; Halbert et al., 1990a, Álvarez, 2000) y generalmente coincide con el punto más estrecho de luz dentro del canal cervical. La distancia entre el anillo más excéntrico y el anterior (caudalmente) valorada por Halbert et al. (1990a) es 9,8 mm con un diámetro menor de luz cervical de 2,7 mm y un mayor de 6 mm. Valores similares han sido encontrados por Álvarez (2000) en la raza Churra (diámetro mínimo de 2 mm y distancia entre el anillo más excéntrico y el anterior de 9,5 mm).

Utilizando la técnica de resonancia magnética para determinar la evolución del diámetro de la luz cervical, Álvarez et al., (2001) encuentran que el umbral del diámetro interno, que diferencia la zonas anchas de las estrechas, está a un diámetro de 3 mm, y que la zona más estrecha coincide con la ubicación del segundo anillo donde el diámetro de luz cervical es mínimo (Tabla 3).

Tabla 3. Diámetro de luz cervical y distancia correspondiente desde el Orificio uterino externo (OUE) a nivel de cada anillo cervical en la raza Churra. Determinación mediante resonancia magnética. (Álvarez et al., 2001).

Anillo cervical	Diámetro (mm)	Distancia desde el OUE (mm)
- Primero	3,68 ± 1,84	5,23 ± 2,60
- Segundo	1,01 ± 0,50	15,60 ± 6,25
- Tercero	2,21 ± 1,59	25,08 ± 7,24
- Cuarto	1,96 ± 0,92	37,19 ± 6,87
- Quinto	1,84 ± 0,91	48,25 ± 3,40

Media ± desviación estándar

4.2.-ANATOMÍA MICROSCOPICA

Microscopía óptica

El corte transversal del cérvix de la oveja consta de tres capas al igual que en el resto de las especies domésticas. Moré (1984) realiza una detallada descripción de esta estructura que a continuación se expone:

- EPITELIO: Es columnar alto y simple excepto en ciertas áreas muy limitadas en que consta de 4 a 6 capas. Está ordenado en grandes pliegues pero no se evidencian en los espacios entre dichos pliegues glándulas tubulares o enrolladas, aunque algunos autores las hayan citado (Parez y Duplan, 1987). Esta confusión ha surgido porque el recubrimiento epitelial mucosecretor está plegado en profundos surcos y túneles que le proporcionan el aspecto de glándulas tubulares ramificadas a las que, inapropiadamente, se las ha denominado “glándulas endocervicales” (Wheater *et al.*, 1987).

Histológicamente se observan tres tipos celulares distintos:

- células altas ciliadas
- células secretoras no ciliadas
- células “clavija” con forma de cuña (solamente observadas en microscopía electrónica, (Wergin, 1979)).

Este epitelio sufre cambios cíclicos, como el resto de las partes del tracto reproductivo, alcanzando la máxima altura y actividad secretora durante el celo. Histoquímicamente, las sulfomucinas se producen en las células situadas en las partes de los pliegues cervicales cerrados al lumen mientras que, en las células situadas en las partes superiores, el mucus es más abundante en sialomucinas (Heydon y Adams, 1979). Moré (1981) no encuentra diferencia en la proporción de células ciliadas en los cérvix de ovejas a lo largo del ciclo estral, hecho que sí ocurre en la vaca (Wrobel, 1971). En el orificio interno, el epitelio se fusiona con el epitelio columnar del útero. En el orificio externo se reemplaza por el epitelio vaginal estratificado pero no hay una transición gradual, sino que los dos epitelios están superpuestos, el epitelio estratificado está cubierto por la capa superficial de células cervicales.

- CAPA MUSCULAR: consta de dos capas:
 - una gruesa capa interna compuesta por un haz circular y otro radial.
 - una fina capa externa compuesta por un haz longitudinal.

Los diferentes haces de musculatura lisa están embebidos en tejido conectivo denso. Durante la gestación existe un gran aumento del músculo liso uterino tanto por incremento en el tamaño celular como en el número de células.

Según la disposición y la orientación de los haces musculares, este autor describe cinco capas bien definidas entre la serosa y la superficie epitelial:

- 1- Inmediatamente debajo de la superficie del epitelio existe una delgada capa de tejido conectivo suelto. Contiene algunas fibras musculares lisas orientadas longitudinalmente entre las fibras colágenas, reticulares y células del tejido conectivo. Tiene un grosor de 0,60-0,75 mm.
- 2- La segunda capa es densa y gruesa, se compone de haces mixtos de musculatura lisa irregularmente dispuestos, la mayoría de las veces,

dispuestos en forma circular y, excepcionalmente, oblicuas y transversas. Cada haz está rodeado por tejido conectivo denso (fibras colágenas). Tiene 4-5,5 mm de espesor.

- 3- La tercera capa consta de una delgada lámina de tejido conectivo, 2-2,5 mm de espesor, que contiene pequeños haces musculares lisos orientados longitudinalmente y grandes vasos que aseguran el suministro de sangre al cérvix.
- 4- La cuarta capa, densa y regular, consta de haces longitudinales con escasas y delgadas fibras colágenas. Tiene un espesor de 1-1,1 mm.
- 5- Por último, al lado de la serosa, se observa una quinta capa que tiene de 0,75-0,8 mm y consta de fibras de tejido conectivo denso sembrada con escasos haces de músculo liso con orientaciones oblicuas y transversales.

Todas las capas de la musculatura cervical contienen fibras reticulares, pero estas son más numerosas en la primera capa; las fibras elásticas sólo son observadas en la pared de los vasos sanguíneos.

- **SEROSA:** el peritoneo limita externamente al cuello y está constituido por una delgada capa de tejido conectivo aerolar cubierto por células mesoteliales.

Microscopía electrónica

El estudio del cérvix mediante microscopía electrónica de barrido, el análisis de su superficie, de las características morfológicas de las células y de la organización tisular del epitelio ha sido llevado a cabo por varios autores (Marinov, 1968; Hafez y Kanagawa, 1972).

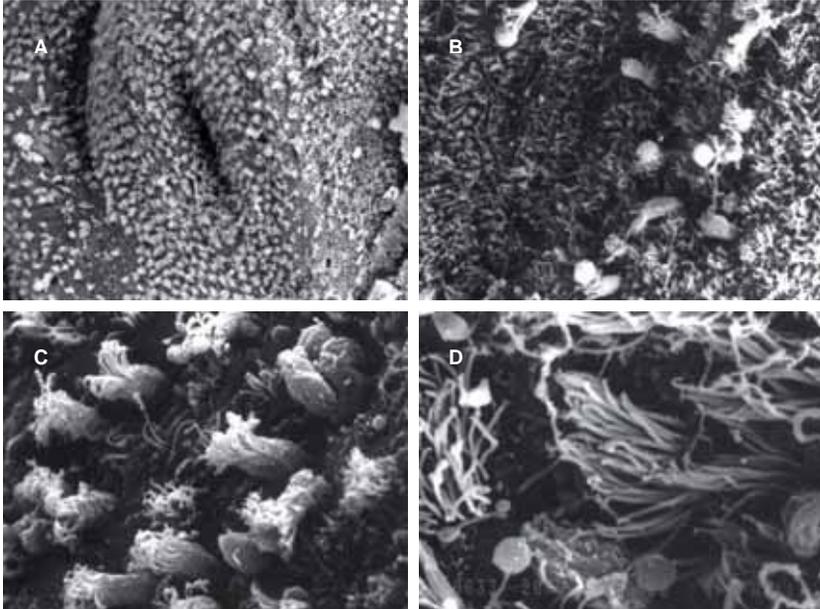
La mucosa cervical está compuesta de numerosos y gruesos pliegues superpuestos que pueden ser principales y secundarios. Los pliegues principales o anillos son cuatro e incrementan su altura en dirección craneocaudal., la mucosa tiene además pliegues secundarios, terciarios y, a menudo, cuaternarios. Las células que componen dichos pliegues, son más o menos uniformes en el tamaño y en muchos casos, se recubren de material secretado y residual (Hafez y Kanagawa, 1972). Por lo tanto, la superficie del canal cervical es muy irregular debido a la presencia de pliegues y criptas que ahondan en el estroma cervical. Las criptas cervicales están tapizadas por células columnares que pueden ser de dos tipos:

- células no ciliadas o secretoras
- células ciliadas

La ultraestructura de la superficie revela que las células ciliadas y no ciliadas varían en diferentes segmentos del endocérvix a lo largo del ciclo, y esta variación se refleja especialmente en la abundancia de células ciliadas, en el número y estructura del microvilli y en la naturaleza de los gránulos adheridos.

Figura 5. Microanatomía del epitelio del cérvix ovino (SEM). Pliegues y criptas cervicales (A) x200. Células ciliadas y secretoras (B) x1000. Células secretoras

recubiertas por cilios de las células ciliadas (C) x2000. Detalle de células ciliadas (D) x5000.



4.3.-FISIOLOGIA DEL CUELLO UTERINO DE LA OVEJA

El cérvix y sus secreciones juegan un papel importante en el proceso reproductivo de los mamíferos. Pero esta relevancia varía según el tipo de deposición seminal que tenga cada especie. En la yegua y en la cerda, el semen es depositado por monta natural en el útero, lo mismo que ocurre en la vaca cuando se realiza la inseminación artificial; en estas especies el moco puede ser usado indirectamente como un indicador del estado del ciclo o del estado hormonal de la hembra. Por el contrario, en la especie que nos ocupa y en el hombre, el semen se deposita en la vagina y el cérvix está directamente involucrado en el proceso de la concepción (Cole y Cupps, 1984).

El cérvix supone asimismo una barrera mecánica en el proceso de avance de los espermatozoides; este obstáculo anatómico limita la inseminación por vía vaginal, por lo que estudios sobre dilatación cervical suponen una vía alternativa para conseguir un mayor diámetro de su luz y la posibilidad de obviar parcial o totalmente el tránsito cervical. Por otro lado, la dilatación cervical puede alterar la normal fisiología hormonal e incluso alterar la ovulación con lo que su “a priori” efecto positivo se ve oscurecido por una reducida fertilidad (Kalifa *et al.*, 1992). Este hecho justifica la importancia de dos aspectos básicos relativos al cérvix y a su vez íntimamente relacionados con la inseminación por vía vaginal: el moco cervical y la dilatación cervical.

Las propiedades físicas y químicas del moco cervical determinan la penetración de los espermatozoides en el cérvix y su llegada al lugar de fertilización. El moco, como

secreción que ocupa el conducto cervical, puede actuar como una barrera o como un agente favorecedor en el proceso de fertilización. (Linford, 1974; Alexander, 1981; Mole, 1990, Harada, 1990).

En cuanto a barrera, ésta puede ser a su vez de naturaleza física o química (inmunológica). De hecho, existe un periodo muy limitado dentro de un ciclo sexual en el cual el moco permite el paso de espermatozoides. La máxima penetrabilidad de espermatozoides ocurre durante la fase ovulatoria, con marcada reducción antes y después de este corto periodo de tiempo. Los primeros estudios aparecen al intentar explicar la infertilidad de ciertas parejas y al comprobar, en test postcoitales, que el moco de ciertas mujeres impide el paso de espermatozoides o los inmoviliza completamente una vez que han penetrado. Un balance hormonal anormal se refleja en las propiedades del moco y lógicamente en su penetrabilidad. Así surge la posibilidad de inducir un moco cervical hostil a la penetración espermática mediante tratamiento hormonal como un medio de contracepción. En este aspecto, Moghissi (1966) demostró que un tratamiento con progestágenos en la mujer produce un moco incompatible con la penetración espermática, estableciéndose, por primera vez, que un tratamiento hormonal que modifica el moco es un medio eficaz de contracepción.

Por otro lado, resulta extraordinario que una hembra no llegue a sensibilizarse a las proteínas del plasma seminal como resultado de su actividad sexual (Mortimer *et al.*, 1986). De Fazio y Ketchel (1971) han sugerido que algunas proteínas son comunes en el moco cervical y en el plasma y por eso el semen no sería reconocido como un agente “extraño”. En el moco se han encontrado inmunoglobulinas, IgA y IgG. Algunos casos de baja fertilidad en el hombre y especies domésticas podrían deberse a la presencia de sustancias espermicidas producidos por las células cervicales (Maksimov *et al.*, 1990; Wrona, 1995). La fertilidad en vacas se ve aumentada cuando el número de leucocitos en el moco cervical en el momento de la inseminación es mínimo (Okada, 1991). De la misma forma se han encontrado aglutininas espermáticas en el moco cervical y en suero sanguíneo en vacas repetidoras y ello puede afectar negativamente a la fertilidad (Basu, *et al.*, 1990; Hotta *et al.*, 1990) comparándolo con el moco cervical de vacas con una fertilidad normal (Wang, 1989). Maksimov *et al.* (1990) y Maksimov y Kazarovets (1991) observan una clara disminución de la fertilidad (del orden de 30 puntos) en ovejas cubiertas con moruecos cuyo semen tenía una baja compatibilidad en el moco cervical (la compatibilidad se evaluó mediante prueba alérgica cutánea). En este aspecto, la inseminación de vacas repetidoras con semen de toro de la misma raza consecutivamente puede causar un incremento del nivel de anticuerpos en el suero y moco cervical contra espermatozoides de esa raza. Cuando se insemina con semen de raza distinta, frente a la cual no hay aglutininas, aumenta la fertilidad. La penetración en moco cervical de espermatozoides frente a los cuales hay aglutininas es menor que en moco en el cual no hay anticuerpos, sin embargo, las distancias recorridas por los espermatozoides en secreciones uterinas siempre son mayores que en las cervicales por lo que la tasa de fertilidad aumenta en vacas con infertilidad de tipo inmunológico cuando se deposita el semen en el útero (Szczubial, 1997).

El moco cervical producido bajo los efectos de los progestágenos, habitualmente usados para la sincronización del celo, tiene un efecto negativo sobre el transporte espermático y la fertilidad en la IAO. Otro factor negativo que afecta a los resultados de la inseminación es el impedimento mecánico que supone el cérvix en la deposición

seminal, por lo que es interesante analizar los mecanismos fisiológicos de dilatación cervical y el posible uso de aquellas drogas que faciliten dicha dilatación.

Técnicas de inseminación artificial en la oveja

**Factores que influyen en los resultados de
inseminación**

**Selección y manejo de las ovejas sometidas a
inseminación artificial**

1.INTRODUCCIÓN

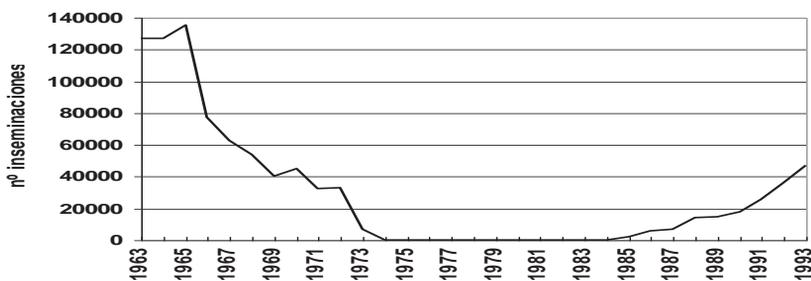
La difusión de la inseminación artificial ovina (IAO) ha sido, y es en la actualidad, un tanto irregular debido a la multitud de factores que han frenado su propagación.

Debido a esto, la IAO que debería ser, como en otras especies, una técnica fundamentalmente aplicable en el proceso productivo, y con su máxima justificación empleada como herramienta imprescindible en los esquemas de mejora genética, en los países de nuestra área geográfica, adquiere un papel secundario en los procesos productivos de la especie ovina, y su desarrollo marginal lo es casi siempre alrededor de los esquemas selectivos de diferentes razas (7).

La IAO, independientemente de los factores técnicos, se ha visto particularmente ralentizada por las peculiares características de las explotaciones ovinas y de sus ganaderos. Este tipo de explotación ha estado y está regida por una serie de normas de actuación basadas fundamentalmente en aspectos tradicionales, siendo especialmente reacios los ganaderos a asimilar y poner en práctica los adelantos que las nuevas técnicas van poniendo a su alcance. Igualmente hay que considerar el implante económico-social y geográfico de la mayoría de las explotaciones ovinas, para de esta forma entender el retraso tecnológico que este tipo de ganadería arrastra de una forma secular (2). Sin profundizar más en estos temas que escapan de los aspectos puramente técnicos, hay que pensar que la viabilidad de las explotaciones ganaderas, pasa indefectiblemente por la modernización y consiguiente tecnificación de los sistemas de manejo y producción, como única vía de producir mejor y más barato, y por lo tanto de poder ser competitivo en el mercado unificado. A este respecto, la IAO constituye uno de los pilares básicos de la selección y mejora genética, y por ende de los sistemas productivos.

La evolución del número de inseminaciones en los últimos años, supone un buen índice del actual del grado de aceptación de una técnica, que si bien está todavía lejos de presentar una difusión pareja a la de otras especies de renta, confirma el progresivo desarrollo de la misma, fundamentalmente en el sector delovino de aptitud láctea.

El estudio relativo a la difusión de la IAO en España, puede ser un ejemplo ilustrativo del sinuoso camino recorrido por la técnica.



Actualmente, no sólo los núcleos de selección de las razas autóctonas (verdaderos impulsores del desarrollo de la IAO en España) demandan el uso de esta

técnica, sino que las poblaciones basales de dichas agrupaciones raciales y lo que es más importante, las agrupaciones mixtas (de razas extranjeras, principalmente de aptitud láctea) se convierten potencialmente en los más importantes sujetos para la aplicación de la inseminación artificial, debido fundamentalmente a la posibilidad de importar Genética a través del semen congelado.

Desde un punto de vista puramente técnico, en la problemática de la IAO hay que tener en cuenta multitud de factores a la hora de explicar las "bajas" o cuando menos variables tasas de fertilidad que se obtienen tras su uso.

Así, se consideran por un lado los factores dependientes de la hembra como son la especial configuración del cuello uterino de la oveja, la necesidad del empleo previo a la IAO de las técnicas de inducción y sincronización del celo (ejercen un efecto depresivo sobre el transporte espermático, e incrementan el porcentaje de espermatozoides muertos presentes en el oviducto (Quinlivan and Robinson, 1967; Hawk et al., 1981), la estacionalidad de la especie y el propio manejo de las hembras que puede determinar una disminución de las tasas de fertilidad obtenidas.

El otro gran grupo de factores que limitan la eficacia de la IAO, hacen referencia al macho a través de su producción seminal, siendo algunos de los puntos claves, la gran diversidad de las características seminales dentro de las razas, individuos y eyaculados de un mismo morueco, y la más que variable respuesta de los eyaculados a los procesos de diluyocervicización, fundamentalmente a la congelación (Fiser et al., 1987).

En la actualidad, y por lo que se refiere a la tecnología de conservación seminal y más concretamente a la congelación del semen de morueco, se han obtenido resultados más que fiables (Fiser et al., 1987; Anel et al., 2003), lo que permite ser optimista de cara a la difusión del empleo del semen descongelado de morueco, siempre y cuando se solucionen otra serie de aspectos conflictivos, de los cuales el más importante es la vía de aplicación seminal.

Todos los factores limitantes de la IAO hasta aquí resumidos, han sido el motivo de multitud de investigaciones encaminadas a mejorar los resultados de la técnica de inseminación, resolviendo de alguna manera los problemas expuestos con anterioridad. Así, se han conseguido mejorar los resultados de la IAO empleando celo espontáneo (Berg and Aamdal, 1991; Tanekata et al., 1985), inducción de la ovulación mediante el empleo de factores hipotalámicos (GnRH) o gonadotropinas (HCG) (López, et al., 1987), practicando la inseminación intrauterina bien por vía transcervical (Ali and Tischner, 1988; Halbert et al., 1990a) o por vía laparoscópica (Maxwell and Butler, 1984; MacKelvey et al., 1985; Tanekata et al., 1985; Maxwell, W.M.C., 1986; Halbert et al., 1990b; Anel, et al., 1992a,b).

Si bien es cierto que algunas de estas alternativas incrementan las tasas de fertilidad (IA intrauterina, celo espontáneo, refrigeración), no dejan de ser unas medidas transitorias, aplicables en tanto se solucionan toda una serie de problemas que permitan realizar la IAO en las condiciones óptimas, es decir:

- En cualquier época del año.
- Empleando técnicas de inducción y sincronización del celo.
- Usando semen descongelado
- Mediante la vía vaginal con aplicación intrauterina transcervical.

Estos cuatro axiomas, constituyen el fundamento sobre el cual, la IAO podrá adquirir el grado de difusión que la técnica de inseminación ha alcanzado en otras especies como la bovina.

En principio, debemos de partir de la base de que el empleo de la técnicas de inducción y sincronización del celo, son prácticas indispensables para el empleo de la IAO, teniendo en cuenta los sistemas de explotación que existen en nuestra área geográfica de influencia, y sobre todo el número de cabezas/explotación presentes en la misma. Además, el empleo de este tipo de técnicas, supone un método eficaz (en combinación con un manejo adecuado del rebaño) para soslayar el inconveniente que de cara a la reproducción de esta especie en determinadas épocas del año, presenta la actividad sexual estacional de la oveja. No obstante, y en el mejor de los casos, los resultados de la inseminación pueden verse afectados por la época del año en que ésta se realice.

Por otro lado, tal y como ya comentamos en párrafos anteriores, la viabilidad "per se" del semen descongelado de morueco, ha mejorado sensiblemente en los últimos años, con la incorporación de técnicas de diluyoconservación que ofrecen tras la descongelación tasas de recuperación espermática, que si en alguna medida son todavía mejorables, suponen en la actualidad una cierta garantía de viabilidad como para poder esperar resultados aceptables de fertilidad tras la inseminación (Anel et al, 2003; Salamon y Maxwell, 1995a, 1995b y 2000). No obstante, estos resultados están fundamentalmente limitados por el lugar de aplicación de la dosis seminal. Si ésta es depositada en el cérvix o en el fondo de la vagina (lugares preferentes en la inseminación por vía vaginal), los resultados obtenidos tras la inseminación son realmente desalentadores (Tanekata et al., 1985; Maxwell and Hewitt, 1986), mientras que la aplicación intrauterina del semen descongelado ofrece unas tasas de fertilidad más que aceptables entre un 55-85% según diversas técnicas y autores (Ali and Tischner, 1988; Anel et al., 1992a,b; Halbert et al., 1990; López, A., 1992; Maxwell, W.M.C., 1986; McKelvey et al., 1985).

En consecuencia, y admitiendo la necesidad (y posibilidad actual) de realizar la IAO en cualquier época del año, previa inducción y sincronización del estro, la posibilidad de emplear semen descongelado en los programas de inseminación artificial ovina, pasa indefectiblemente por aplicar una técnica de gametización instrumental, que permita depositar la dosis seminal dentro del útero de la oveja, siendo la situación óptima el poder realizarlo por vía vaginal en una inseminación transcervical.

Este punto, constituye en la actualidad el fundamento de numerosas líneas de investigación, puesto que la barrera fisiológica que supone el cérvix de la oveja, supone así mismo un grave impedimento para que el catéter de inseminación pueda alcanzar (vía vaginal) el interior del útero.

2. CUELLO UTERINO

El cuello uterino de la oveja es la estructura anatómica del útero que conecta la cavidad uterina con el fondo de la vagina. Está constituido por tejido conjuntivo, condensaciones de fibras musculares y glándulas secretoras (situadas en su parte más interna, son las encargadas de producir el moco cervical), que aísla las porciones más craneales del aparato genital de la hembra excepto en el momento del parto y de la fecundación. Este estancamiento se ve considerablemente reforzado por efecto de los pliegues presentes en el interior del canal cervical, los cuales dejan un paso muy estrecho y tortuoso que es considerablemente difícil de atravesar por la pipeta de inseminar. Este aislamiento tiene un efecto protector de cara a evitar infecciones en los tractos superiores.

More, J. (1979) y Bunch y Ellsworth (1981) han llevado a cabo estudios sobre las características anatómicas y macroscópica del cuello uterino de la oveja, mostrando que el cérvix, porción más caudal del útero, tiene una luz constreñida y rodeada por una pared de tejido músculo-conectivo. En el momento del estro el cérvix se relaja ligeramente bajo la influencia de los estrógenos, permitiendo el paso de los espermatozoides, pudiéndose atravesar, con la pipeta de inseminación, el cuello uterino de especies como la vaca o la cabra. Sin embargo, en la oveja, según estos autores, es difícil conseguir una penetración de más de 7-10 mm durante el estro.

La imagen que ofrece una sección transversal de un cérvix ovino y la replicación mediante moldes, demuestran la naturaleza tortuosa de su luz, que es semejante a un sacacorchos. El canal de paso tiene una longitud media de unos 5,5 cm y la morfología interna se caracteriza por la presencia de 6 pliegues anulares, aunque algunos autores señalan entre 4 y 6 pliegues (Barone, R., 1978). La proliferación más destacada se encuentra en el segundo pliegue de la cara vaginal. En todos los casos analizados por estos autores, el segundo pliegue se presentaba con un alineamiento diferente respecto al primero. Por ello, pasar un instrumento recto más allá del segundo pliegue es prácticamente imposible, aún cuando el cuello sea manipulado. El resto de los pliegues anulares se presentan más o menos alineados. En el caso de la cabra el cérvix es considerablemente menos tortuoso y los pliegues anulares presentan un alineamiento concéntrico. En concreto, el segundo pliegue nunca es excéntrico respecto al primero, lo que explica la mayor facilidad de atravesar la pipeta de inseminación en la cabra que en la oveja. Además, en la oveja, se observan diferencias interespecíficas en la complejidad de los pliegues cervicales (organización del interior y orificios externos, longitud y complejidad de la luz cervical), así como en las relaciones anatómicas con el cuerpo uterino y la vagina.

El extremo posterior del cérvix se proyecta dentro de la vagina y forma uno o más pliegues del tejido fibroso que se observa fácilmente en la pared vaginal. Estos pliegues, que delimitan el orificio uterino externo, por el cual se comunica el cuello con la vagina, tienen diferente morfología y número así como una situación variable referente al fondo de la vagina y al orificio de entrada. Teniendo en cuenta todo ello, von Reinhold et al. (1987) y Halbert et al. (1990a) establecieron cuatro tipos básicos (pico de pato, roseta, en solapa y espiral).

Alvarez et al. (1994a,b, Alvarez 2000) y Chamorro et al., (1994) han realizado diversos estudios referentes a la tipología del orificio uterino externo en la oveja churra y la penetración de la pipeta de inseminación, así como la utilización de resonancia nuclear magnética para la determinación de las características anatómicas en el cuello uterino de la oveja (Alvarez et al., 2001). La variabilidad morfológica observada en esta raza ha obligado a introducir nuevos tipos, cráter, hendidura y canal además de los anteriormente señalados. Según los datos obtenidos sobre 1086 ovejas, los tipos solapa con un 46 %, y roseta con un 33 %, son los más frecuentes, frente a los tipos pico de pato (9 %), cráter (4 %), hendidura (2%) y canal (1,5 %).

3. TÉCNICAS DE INSEMINACION

3.1. ALTERNATIVAS

Actualmente se admiten dos vías para la aplicación de la dosis seminal, que son: la vía vaginal y la vía laparoscópica (Anel et al 1995). Con la vía vaginal se puede

conseguir la inseminación, intracervical (a diferentes profundidades) y transcervical (intrauterina).

La escasa frecuencia con que se consigue la inseminación transcervical, vía vaginal, implica la utilización, casi obligatoria, del semen fresco o a lo sumo refrigerado. En cambio, la técnica laparoscópica, al permitir la aplicación intrauterina del material seminal, se muestra como la vía de acceso idónea para la utilización de semen descongelado.

Como dato ilustrativo, señalar que en Francia en el año 1988, de un total de 600.000 inseminaciones, poco más de 1% lo fueron por vía laparoscópica (6.527) (Brice et al., 1991), observándose que, en los últimos años, estas cifras se han modificado de forma muy ligera. En cambio en países como Australia se observa una mayor difusión, en el año 1986 se inseminaron 60.000 ovejas por vía laparoscópica y en el año 1988, 87.000.

Por lo que hace referencia a nuestro país, de las aproximadamente 45.000 inseminaciones realizadas en 1993, un 25% correspondió a las aplicadas mediante la vía laparoscópica (aproximadamente 11.000).

3.2. CONSIDERACIONES GENERALES PREVIAS

Aunque de forma somera, conviene señalar algunos de los aspectos preliminares, que aún no teniendo una relación directa con las técnicas de aplicación seminal, repercuten en los resultados finales obtenidos tras la inseminación (porcentaje de hembras gestantes).

Conformación de los lotes de inseminación. Considerar tipo de animales, edad, estado corporal y productivo y tamaño de los lotes.

Tratamientos de inducción y sincronización del celo. Selección adecuada de un tratamiento, entre los muchos disponibles, fundamentalmente en función de la edad, estado corporal y estado productivo de los animales.

Época del año. Considerar, desde un punto de vista técnico y económico, la época de inseminación en función de las variaciones que las diferentes estaciones del año determinan en el rendimiento de la técnica de inseminación.

3.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVINA POR VIA VAGINAL.

La aplicación de la dosis seminal por vía vaginal representa, en la actualidad, la técnica de inseminación artificial más difundida en la cabaña ovina.

No obstante la difusión de esta técnica de reproducción asistida, se ha visto frenada ante la imposibilidad de utilizar semen descongelado, debido a las bajas tasas de fertilidad que se obtienen por esta vía, limitándola al empleo de semen fresco o refrigerado.

3.3.1. Equipamiento e instrumental

El equipo necesario para realizar la técnica de inseminación artificial ovina por vía vaginal es muy simple (Foto nº 4). Consta de: un vaginoscopio, preferentemente de tipo pico de pato, ya que este modelo permite una mejor visualización y localización del cérvix y es más fácil de limpiar, con una fuente de luz incorporada que se conecta a una

batería. Una pistola de inseminación para aplicar el contenido de las pajuelas y las vainas de material plástico de un solo uso con las que se cubre la pistola de inseminación. En el caso de que el semen no este envasado en pajuelas se emplearía una jeringa unida a una pipeta de plástico.

3.3.2. Contención de los animales

Para la correcta aplicación de esta técnica es importante que los animales estén bien colocados y sujetos. El método más cómodo y adecuado consiste en utilizar los amarres de la sala de ordeño o del aprisco si los hubiera. Una vez sujetos los animales, un operario levanta el tercio posterior en el momento de realizar la inseminación (Foto nº 5). En el caso de que no se dispusiera de amarres, la operación de contención deberá realizarse individualmente, bien contra una de las esquinas del redil o bien empleando el método denominado "sobre la barra" que consiste en colocar la parte posterior del animal sobre la telera o barra del redil. En cualquier caso y por ser un error cometido frecuentemente, señalar que no se debe realizar una tracción de la cola, ya que esta operación, si bien puede facilitar la sujeción del animal, perjudica notablemente el acto de la inseminación, al producirse una desituación del cérvix y su proyección vaginal.

3.3.3. Dosis seminales

Existe gran número de estudios referentes al número idóneo de espermatozoides a aplicar en la inseminación ovina por vía vaginal. Este valor dependerá, fundamentalmente, del método de conservación seminal empleado.

De forma genérica se establecen unas dosis seminales de 100×10^6 spz para el semen fresco diluido y 400×10^6 spz para el semen refrigerado (5°C ó 15°C) y descongelado (poco usual). El volumen de inseminación varía según los distintos autores, siendo los más empleado 0,25 ml (pajuela mini ó 2 pellets) ó 0,50 ml (pajuela maxi).

3.3.4. Tiempo idóneo de inseminación

Tal y como se ha señalado con anterioridad, la inseminación artificial ovina, en el área geográfica de nuestro entorno, se emplea casi con exclusividad previa inducción y sincronización del estro (Greyling, 1997). Esto supone una aplicación del semen a tiempo fijo que deberá de calcularse a partir del momento en que son retiradas las esponjas intravaginales del progestágeno.

Este tiempo varía ligeramente en función de factores como la raza, zona geográfica, etc.. No obstante, se puede admitir que dicho periodo oscilaría entre las 54 ± 1 horas y las 58 ± 1 horas, cuando se realice una sola inseminación.

En España, se emplea fundamentalmente las 55 ± 1 horas para la mayoría de las agrupaciones ovinas en las que se práctica esta técnica reproductiva.

El empleo de la doble inseminación por ciclo, si bien supone una práctica que mejora los resultados de esta técnica, complica notablemente el manejo de los animales por lo que constituye una práctica inusual. Las horas de inseminación referidas al momento de retirada de los pesarios intravaginales, serían de 48 ± 1 horas para la primera aplicación y de 60 ± 1 horas para la segunda.

3.3.5. Ejecución de la técnica

En la inseminación artificial ovina por vía vaginal podemos encontrarnos con dos posibilidades, por un lado la inseminación vaginal ciega (deposición antecervical,

en fondo de vagina) y por otro la inseminación vaginal instrumental (antecervical, intracervical y transcervical).

La aplicación antecervical (fondo de vagina) de la dosis seminal se utiliza preferentemente en corderas y animales en los que no es posible, debido a su estrechez, introducir el vaginoscopio (vaginal ciega), así como en aquellos animales en los que no resulta posible localizar o alcanzar el cérvix aún cuando se emplee el vaginoscopio (vaginal instrumental). La dosis seminal debe depositarse en la vagina lo más profundamente posible. Para el caso de la aplicación vaginal ciega se separan con los dedos los labios de la vulva y se introduce, todo lo que se pueda y con sumo cuidado, la pistola de inseminación, llevando la punta de la misma por la parte superior de la vagina para evitar que se entre, de forma accidental, por la uretra.

En la inseminación vaginal instrumental, se introduce el vaginoscopio con las valvas paralelas a los labios de la vulva y sin forzar demasiado para evitar lesiones. Una vez introducido, se gira 90° y se abren las valvas, proyectándose la luz en la vagina. A continuación se procede a localizar el cérvix mediante movimientos laterales del vaginoscopio. Si la localización del cérvix resulta difícil conviene cambiar la posición del animal y, en cualquier caso, no debe mantenerse abierto el vaginoscopio durante mucho tiempo para no producir molestias.

Antes de proceder a la inseminación se observará la vagina para eliminar posibles cuerpos extraños (heces, hierbas, etc.). En algunos casos la oveja, debido al nerviosismo se orina, por lo que se procederá a drenar la orina y se dejará al animal para inseminarlo al final del lote. Cuando aparece gran cantidad de moco acumulado en la vagina, es conveniente evacuarlo antes de proceder a la deposición de la dosis seminal.

Una vez que el animal está listo para ser inseminado, se introduce la punta de la vaina de plástico en el cérvix intentando mediante maniobras, laterales y verticales, que la pistola de inseminación penetre lo más profundamente posible (Alvarez et al., 1996; Nikolov, 1997). Cuando ya no se pueda avanzar más, se procederá a depositar la dosis seminal retirando ligera y lentamente el vaginoscopio para evitar que si el semen refluye hacia la vagina (fenómeno habitual) salga hacia el exterior.

Debido a la especial disposición de los pliegues del cuello uterino de la oveja resulta difícil traspasar esta estructura, con lo que la mayoría de las inseminaciones no alcanzan ni siquiera la zona media del cuello uterino (intracervical). Sin embargo en algunos casos, se consigue acceder al útero con lo que esta inseminación se transformaría en transcervical (intrauterina) por vía vaginal.

Para evitar la transmisión de enfermedades, es importante limpiar y desinfectar el material de inseminación entre un animal y otro.

3.3.6. Métodos para mejorar la permeabilidad del cuello uterino.

Varios autores señalan el éxito razonable en la penetración del cérvix de la oveja (Halbert et al, 1990; Naqvi et al, 1998; Ali y Tischner, 1998) permitiendo el uso de la inseminación intrauterina vía vaginal, mediante el desarrollo de una técnica específica. Los exámenes morfológicos del canal cervical, realizados mediante polímeros o moldes de látex en diversas razas de ovinos, muestran que su forma es semejante a una espiral, conteniendo algunos surcos y recesos transversos. Durante el estro el canal se abre un poco, el diámetro aumenta y se licúa el moco cervical, lo que favorecería el paso de la pipeta de inseminación.

Teniendo en cuenta estas características Alí y Tischner (1998) diseñaron una pipeta de inseminación ajustando su forma a la del canal cervical. Dicha pipeta es ligeramente curva en la parte inicial izquierda con una pequeña bola con dos orificios. Con este sistema dichos autores obtuvieron unos porcentajes de fecundación del 70%, aunque el número no muy amplio de ovejas sobre las que realizó la experiencia seguramente haya influido en el porcentaje tan elevado de gestaciones. Halbert y col. (1990b) han desarrollado una técnica de IA en oveja en Canadá, en un intento de poner a punto una técnica y material que pueda ser usado para la IAO comercial con semen descongelado, para lo que han considerado diversas razas, agrupando dentro de cada una a las hembras con el mismo tipo de orificio externo de cuello uterino. Utilizando diversas posiciones, instrumental, técnicas de inseminación, etc., consiguen una técnica aplicable a la IAO de campo con unos porcentajes del 50 al 68% según la raza (Halbert y col., 1990c). No obstante todo este tipo de investigaciones concluyen que existe un marcado efecto racial en las características morfológicas del canal cervical que se emplean para el diseño de los aplicadores específicos. Este hecho constituye un grave inconveniente de cara a la extrapolación de estos métodos a otras agrupaciones raciales ovinas y, en consecuencia, un obstáculo a la difusión de la metodología.

En relación con investigaciones encaminadas a la recolección de embriones en hembras superovuladas para su posterior transferencia, Coonrod et al. (1986) publicaron una técnica para la recogida transcervical de embriones, en la cual se utilizaba un fino catéter que se introducía, a través del cuello uterino en ovejas 6 ó 7 días después del estro. Posteriormente, Barry y col. (1990) utilizaron una modificación de esta técnica, por la cual se inducía una "maduración" del cuello antes de la manipulación para permitir un paso más fácil del catéter Foley durante la recogida de embriones. Los resultados en ambas experiencias fueron un tanto irregulares.

También se han utilizado técnicas basadas en provocar una dilatación del canal cervical aplicando sustancias como prostaglandina E₂ vehiculada en suero fisiológico (Mylne et al., 1992; Audicana et al; 1998; Ataman et al, 2000)) o CO₂ (Fukui et al. (1978), sin resultados esparanzadores, ya que si bien se consigue una dilatación del orificio cervical, no se logra dilatar el canal cervical en toda su longitud.

En resumen, se han ensayado multitud de alternativas con vistas a poder permeabilizar el cérvix y lograr la aplicación seminal intrauterina vía vaginal así como para estudiar los posibles efectos secundarios de las manipulaciones en el cervix (CAmpbell et al, 1996), pero ninguna de las variantes ensayadas representan en la actualidad una alternativa sencilla y fiable que permita realizar este tipo de inseminación con una garantía de obtener, en la mayoría de los casos, el depósito intrauterino de la dosis espermática con una fertilidad aceptable.

3.3.7. Resultados

Los resultados de la inseminación artificial ovina, vía vaginal, son muy irregulares ya que se encuentran influidos por multitud de factores (zona geográfica, época del año, raza, sistemas de manejo y producción, aptitud productiva, explotación, tipo de semen, etc.). Existen numerosos trabajos científicos que constatan, de alguna manera, estas diferencias, pero sería interminable intentar hacer una revisión exhaustiva de todos ellos. Respecto a otros factores como el número de espermatozoides por dosis y la hora de inseminación, que igualmente pueden determinar diferentes tasas de fertilidad, son de uso común criterios generales fijos (con ligeras variaciones), ampliamente contrastados para la mayoría de las agrupaciones ovinas estudiadas.

Cuando se analizan los resultados obtenidos con la IAO sobre diferentes poblaciones raciales de ovino en nuestro país, es muy complicado aislar los factores que justifiquen las variaciones observadas. Estos resultados medios para el año 1993 se cifran en un 49% para la raza Latxa (Urarte, E., 1993) 43% para la raza Manchega (Montoro, V., 1993) y un 38% para la raza Churra (Anel, E. 1993).

En un estudio realizado por Anel et al., (1992a) en la raza Churra, se comprueban las variaciones que determinan el factor explotación y la época del año en que se realiza la inseminación artificial, variaciones que han sido comunicadas por muchos autores en diferentes áreas geográficas y para distintas razas (López, A, 1992, Andersen and Aamdal, 1991). En dicho trabajo se observa una fertilidad media del 28% en invierno (con resultados comprendidos entre el 10% y el 40% para las distintas explotaciones), del 40% en primavera (entre el 5% y el 72%) y del 43% en otoño (entre el 5% y 65%).

Otro factor que determina una gran variación en los resultados de fertilidad, es el método de conservación del material seminal. A modo de ejemplo, Maxwell and Hewitt (1986) obtienen con semen fresco un 60% de fertilidad y con semen descongelado 17,6% empleando la vía vaginal en la inseminación.

En la bibliografía se encuentran resultados anormalmente elevados para la aplicación de semen descongelado por vía vaginal en la oveja, correspondiendo la mayoría de ellos a experiencias realizadas sobre hembras en celo espontáneo, lo que en función de criterios expuestos con anterioridad no es comparable ni aplicable a los protocolos de trabajo que se emplean en nuestra área geográfica de influencia (inducción y sincronización del estro).

3.4. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVINA POR VIA LAPAROSCOPICA

Esta técnica permite incrementar los porcentajes de fertilidad que se consiguen con la inseminación por vía vaginal, independientemente de que se utilice semen fresco, refrigerado o descongelado. Se muestra, por tanto, como el método más eficaz y, en relación al empleo de semen descongelado, como el más conveniente, lo que justificaría la realización de esta técnica de inseminación "a priori" más compleja.

3.4.1. Equipamiento e instrumental

El instrumental, más complejo, que el empleado para la vía vaginal, está compuesto por un endoscopio (normalmente de 7 mm) conectado a una fuente de luz mediante un cable de fibra óptica y dos cánulas con trócar, una para introducir el inyector (5 mm), y el laparoscopio (7 mm), esta última cánula está provista de una llave de entrada/salida donde se fija la conducción que comunica con una fuente de gas (CO₂ o aire filtrado). Por último, para depositar el material seminal en el interior de la cavidad uterina, se necesita un material específico compuesto por un aplicador-palpador y la pipeta de inseminación (de un solo uso).

La pipeta de inseminación, que se monta en el aplicador-palpador es un tubo de plástico abierto en su extremo proximal (por donde se introduce la dosis seminal) y con una fina aguja, en el extremo distal, que permite la punción del cuerno uterino.

El aplicador-palpador posee un cuerpo rígido y una empuñadura de plástico con una rueda dentada que permite mover, en el interior de la pipeta de inseminación, un

fiador graduado que se ajusta al diámetro interno de la pajueta, y desplazar el tapón textil empujando la dosis seminal al interior del útero.

Recubriendo el cuerpo del aplicador, se coloca el palpador (del mismo material), móvil y con una ventana en su extremo distal, que permite proteger la extremidad del aplicador por donde sobresale la aguja del aspí.

Es necesario disponer de un equipo para la desinfección de todo el instrumental.

3.4.2. Contención de los animales

La inseminación intrauterina mediante laparoscopia, al ser una técnica quirúrgica (aunque mínimamente invasiva) requiere del mayor grado de inmovilidad posible de la hembra sujeto del acto quirúrgico. Para este tipo de inmovilización existen dos posibilidades básicas que son: las camillas individuales y el carrusel multipuesto, de tres o más camillas.

Estos sistemas de contención y sujeción de la hembra a inseminar proporcionan, de una parte un grado de inmovilidad aceptable que permite una ejecución correcta de la técnica y, por otro lado al situar a la oveja en un plano inclinado de unos 40 a 45 ° (posición de tren) contribuye, junto con el neumoperitoneo, a una desituación de las vísceras abdominales contra la cara peritoneal del diafragma facilitando de esta manera la visualización y manejo del aparato genital.

El manejo correcto de los sistemas de contención facilitan y aceleran el desarrollo de la propia técnica. Hay que tener en cuenta que un empleo incorrecto de los mismos, no solamente repercutiría en la velocidad y calidad del trabajo a desarrollar, si no que puede determinar algunas lesiones en los animales. Normalmente se recomienda para su empleo en el campo las norias multipuesto, que a la ventaja indudable de ser más económicas, unen otras como una mayor rapidez de trabajo, una reducción del espacio en el lugar a desarrollar la técnica y un menor número de operarios necesarios para el manejo de las hembras en el momento de inseminar.

3.4.3. Dosis seminales

Existe una amplia gama de comunicaciones en cuanto al número de espermatozoides necesarios a vehicular en las dosis seminales utilizadas en la inseminación intrauterina mediante laparoscopia en la oveja (Davis et al., 1984, Maxwell, W.H.C., 1985; Gourley and Riese, 1990). En cualquier caso, todos los autores coinciden en que el empleo de esta vía rentabiliza al máximo el rendimiento de los eyaculados obtenidos, bien sea con semen fresco, refrigerado o descongelado, ya que ha permitido que el número de espermatozoides necesarios por animal inseminado sea mucho menor sin que existan variaciones significativas de la fertilidad obtenida. Así, las concentraciones de las dosis han disminuido sensiblemente hasta $12,5 \times 10^6$ espermatozoides totales/dosis con semen fresco (Brice and Jardon, 1991) y hasta 3×10^6 espermatozoides totales/dosis con semen descongelado (Anel et al., 1994 y 2001).

El volumen de inseminación es otro de los factores que ha sido estudiado y cuantificado específicamente para esta vía de aplicación, llegándose a la conclusión de que pueden emplearse hasta volúmenes de 0,025 ml por cuerno uterino (0,05 ml totales) sin que por ello se vea afectada la fertilidad obtenida. No obstante los volúmenes más usuales se situarían alrededor de los 0,15-0,25 ml totales por inseminación (1 ó 1/2 pajueta mini por oveja).

3.4.4. Tiempo idóneo de inseminación

Los estudios realizados para establecer el momento idóneo de inseminación, indican que la técnica intrauterina de inseminación por vía laparoscópica requiere una menor precisión horaria para su ejecución. El intervalo horario estudiado por algunos autores (Mackelvey et al., 1985; Maxwell et al., 1986; Findlater et al., 1988; Bister et al., 1989) se sitúa entre las 40 y las 78 horas posretirada de las esponjas, obteniéndose los valores máximos de fertilidad entre las 60 y 71 horas. Estos datos, obtenidos para distintas agrupaciones raciales y en diferentes lugares geográficos, parecen indicar que la obtención de buenos resultados de fertilidad podrán verse influenciados por estos factores.

Para la raza Churra, el margen horario estudiado por Anel et al., (1992b) esta comprendido entre 48 y 72 horas posretirada de las esponjas, consiguiéndose los mejores resultados entre las 48-64 horas para ovejas, y las 54-72 horas para corderas.

3.4.5. Ejecución de la técnica

Como un dato previo de interés hay que señalar la necesidad de someter a las hembras que van a ser sujeto de la técnica de inseminación intrauterina a una dieta previa de líquidos y sólidos, cuya duración se fija en función del estado productivo de las hembras (hasta 36 horas para hembras secas y entre 12-24 horas para hembras en lactación). Este ayuno previo persigue fundamentalmente dos fines, en primer lugar al disminuir sensiblemente el contenido del tracto digestivo, facilita la visualización y manejo de todos los órganos abdominales, así como del útero y demás estructuras anejas y de igual forma evita las punciones anormales por excesivo volumen de diferentes partes del tracto digestivo (especialmente la panza) y de la vejiga. En segundo lugar, el incumplimiento de la norma de dieta previa, puede producir algunos procesos, de gravedad variable, en la hembra sujeto de inseminación, siendo las de mayor incidencia el vómito (que puede producir broncoaspiración y muerte del animal), el hipo y disneas.

Una vez fijado el animal en decúbito supino y en una posición de tren de 40-45°, se procede a rasurar y aseptizar la zona de intervención. Para realizar la primera punción, es preciso determinar la posición de las venas (epigástricas caudales superficiales) para evitar que las mismas puedan ser dañadas durante la punción. A continuación, y a través de dicha vaina (7 mm) se induce el neumoperitoneo (con aire filtrado o CO₂). Como ya se ha señalado éste contribuye a facilitar el manejo y exploración del aparato genital de la oveja. Una vez obtenido el neumoperitoneo, se introduce por esta punción el laparoscopio, que nos permitirá mediante una primera inspección visual, establecer las condiciones de trabajo en función de las variaciones individuales que siempre se presentan..

Posteriormente, y a través de la segunda punción (5 mm) se introduce en la cavidad abdominal el palpador-inyector con el que realizaremos las tareas de manejo y aplicación de la dosis seminal.

Una vez localizado el útero se procede a la inseminación sobre la curvatura mayor de los cuernos uterinos, depositando media dosis en cada uno de ellos.

Se pueden visualizar los ovarios para comprobar las estructuras presentes en los mismos. No obstante, esta operación conviene realizarla con sumo cuidado ya que puede constituir un factor negativo en relación con la fertilidad obtenida.

Finalizada la manipulación endoscópica se retira el instrumental, presionando a continuación la cavidad abdominal para forzar la salida del gas inyectado previamente. Posteriormente se retiran las vainas y se aseptiza nuevamente los lugares correspondientes a ambas punciones.

Los animales una vez liberados del mecanismo de contención son reintegrados al aprisco en condiciones normales de manejo.

3.4.6. Resultados

Numerosos trabajos se han publicado a partir de 1982, cuando Killen and Caffery (1982) informan del empleo de una técnica rápida de laparoscopia para la inseminación artificial de la oveja. Todos los autores coinciden en que se mejoran las tasas de fertilidad depositando el semen directamente en la luz uterina. Maxwell et al. (1984b) obtienen con este método y empleando semen descongelado una tasa de fertilidad del 50% (frente al 11% que obtuvieron con el empleo de la inseminación cervical). Vallet et al. (1988) publican unas tasas de fertilidad del 50-70%, tasas similares a las que comunican Findlater et al., (1991), Ali and Tischner (1992), Halbert et al. (1990)a, Maxwell, W.H.C. (1985), Mckelvey et al., (1985), López, A.(1992). En esta misma línea, los resultados comunicados en España, para la raza Churra, por Anel et al (1992a,b) sitúan los porcentajes de fertilidad en torno al 55-65%.

4. CONSIDERACIONES GENERALES POSINSEMINACIÓN

Con respecto a la inseminación vía vaginal, no existe ningún cuidado específico a tener en cuenta, mientras que en la vía laparoscópica, al haberse efectuado un acto quirúrgico (aunque de escasa importancia) es conveniente mantener en buenas condiciones el aprisco (paja limpia y seca) durante algunos días después de realizada la inseminación.

Como norma general aplicable a todas las técnicas de inseminación ovina se recomienda una escasa actividad, mínimo estrés, ausencia de cambios de manejo, etc., durante los días siguientes a los de la aplicación de la inseminación artificial. Se ha observado que el cumplimiento de estas condiciones, mejora los resultados de la técnica.

5. ESTUDIO COMPARATIVO DE AMBAS TÉCNICAS.

Los resultados globales obtenidos mediante inseminación artificial ovina, ya sea por vía vaginal o por vía laparoscópica, pueden verse afectados por una serie de factores (Cappai, 1998, Abroug, 2000), entre los que cabría destacar por su marcada incidencia la época del año, el momento de la inseminación (tras la inducción y sincronización del estro), el número de espermatozoides por dosis y el factor explotación.

Aunque el macho no muestra una estacionalidad sexual tan marcada, como ocurre en el caso de la hembra, también se observan, a lo largo del año, variaciones tanto cuantitativas como cualitativas, en la producción espermática. Los eyaculados obtenidos durante la época de primavera-verano se caracterizan por una menor concentración espermática, junto con un aumento del porcentaje de formas anormales. Sin duda esta menor calidad seminal puede tener influencia sobre los resultados obtenidos con inseminación artificial.

En este sentido y para la raza Ile de France, Colás (1980, 1981) señala que la fertilidad obtenida, utilizando la inseminación por vía vaginal, se sitúa en torno al 47,1% en primavera, mientras que con las inseminaciones realizadas en otoño se

consigue un 68,4% de fertilidad. En la raza churra, los datos obtenidos por Anel et al., (1992a) se encuentran en esta misma línea. En Febrero, los resultados de fertilidad se sitúan alrededor del 28%, mientras que en Mayo y Octubre los porcentajes de fertilidad del 40% y 43% respectivamente. Al utilizar la inseminación intrauterina, estos mismos autores obtienen valores de fertilidad del 59% en Febrero y 65% en Mayo y Octubre.

Esta técnica permite amortiguar, sobremanera, las variaciones estacionales y en consecuencia obtener resultados de fertilidad más o menos constantes a lo largo del año. Al emplear principalmente semen descongelado, nos permite utilizar los eyaculados recogidos en cualquier época del año, aprovechando aquellos con mejores características seminales. Y, teniendo en cuenta, la influencia que el medio ambiente parece ejercer sobre el comportamiento sexual del macho, y que se manifiesta por un descenso acusado de la libido durante la época de contraestación (marzo a septiembre), la inseminación artificial intrauterina nos permite ser independientes con respecto a la época del año en que los animales son reacios a saltar.

Además de la época del año, los resultados también pueden verse modificados por el año que consideremos. Se trata de un factor principalmente climático (años secos, años húmedos,...), que sin duda condiciona la disponibilidad de alimentos (pastos, tipos y calidad de forrajes, etc.).

El momento de inseminación, tras la sincronización del celo, es un factor muy importante, no solo por la repercusión directa que tiene sobre la fertilidad, sino porque a la hora de aplicar la técnica, la vía laparoscópica permite una mayor flexibilidad de horarios.

Generalmente, se acepta que para la vía vaginal el tiempo óptimo de inseminación, son las 54-57 ± 1 hora posretirada de las esponjas, si se realiza una sola inseminación, o las 48 horas y 60 horas si se opta, como indicábamos anteriormente, para la doble inseminación. Transgredidos esos márgenes horarios el % de ovejas paridas, que se sitúa en torno al 30-50% para razas españolas y al 45-60% para otras razas europeas, disminuye drásticamente. Para la vía laparoscópica el margen horario es más amplio y se sitúa entre las 40 y las 78 horas posretirada de las esponjas, obteniéndose los valores máximos de fertilidad en torno a las 60-72 horas.

Estos datos, nos permiten concluir que la inseminación por vía laparoscópica proporciona un margen horario amplio, permitiendo adecuar al horario de la granja el momento de realizar la inseminación, y otras técnicas relacionadas con ella. Así, esta técnica concede un cierto control sobre cualquier tipo de imprevistos, sin afectar a los resultados de fertilidad.

Otro aspecto importante de la aplicación de la técnica de inseminación artificial, es el número de espermatozoides que se deben emplear por dosis. Generalmente, se acepta que para la inseminación cervical, son necesarias dosis de 100 (fresco) a 400 (refrigerado o descongelado) millones de espermatozoides, si se desean obtener buenos resultados de fertilidad. En la inseminación intrauterina, los datos obtenidos apuntan a que no existen diferencias en los resultados de fertilidad cuando se utilizan dosis de 80 - 50 - 25 - 12 - 6 o 3 millones de espermatozoides (et al., 1984, Maxwell, W.H.C., 1985; Gourley and Riese, 1990; Brice and Jardon, 1991; Anel et al., 1994).

La explicación a estas diferencias en el número de espermatozoides por dosis, necesarios para una u otra vía de inseminación, se apoya en bases fisiológicas. En las especies de eyaculación intravaginal (caso de los pequeños rumiantes) el cuello uterino representa una barrera selectiva para el transporte espermático (Hunter and Nichol, 1983). Si utilizamos una vía de inseminación que acceda directamente al útero

(actualmente, la vía laparoscópica) lograremos superar esta barrera, lo que nos permitirá utilizar menor número de espermatozoides por dosis. Esto representa un mayor rendimiento de los eyaculados, con las ventajas zootécnicas que lleva implícitas.

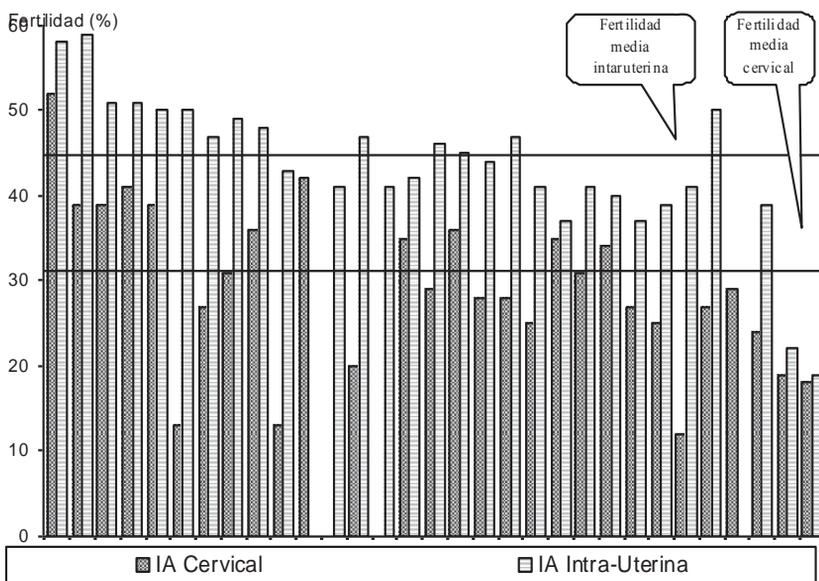
Por último, queremos señalar, que aunque el factor explotación, no es un tema que entre de lleno en la aplicación de la técnica, es necesario tenerlo en cuenta. Factores como, manejo de los animales, alimentación, sanidad, estado corporal... etc., tienen una gran influencia sobre la actividad sexual del rebaño, y no debemos olvidar, que al utilizar técnicas de reproducción asistida, estamos forzando la función reproductora de estos animales. Por otra parte, es uno de los factores que peor se controla, siendo a veces la causa de los "pobres" resultados obtenidos, cuando se trabaja a nivel de campo.

En el trabajo realizado por Anel et al. (1992a), se observa para la inseminación por vía vaginal variaciones en los resultados de ovejas paridas, entre explotaciones, que oscilan entre el 5% y el 72%, frente al 40% y el 70% en la inseminación intrauterina. Esta mayor o menor variabilidad de resultados, según se trate de inseminación cervical o inseminación intrauterina, respectivamente, se aprecia independientemente de la época del año que consideremos (Febrero: 10% a 40% para inseminación cervical, frente al 40% a 70% para intrauterina. Mayo: 5% a 72% -cervical- frente al 48% a 74% intrauterina. Octubre: 5% a 65% -cervical- frente al 50% a 72% -intrauterina).

6. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVINA

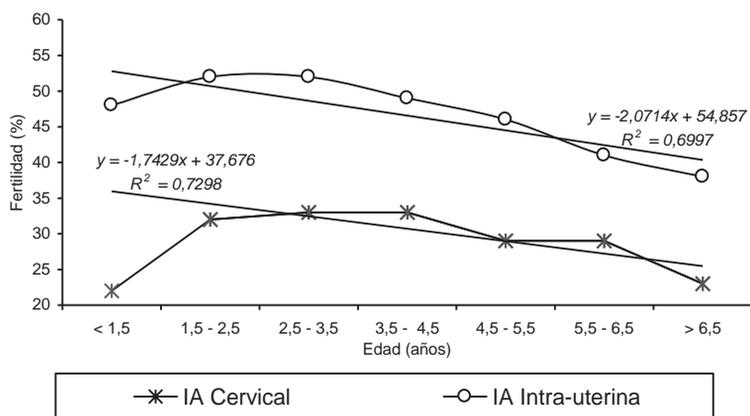
Como ya se ha comentado, los resultados de la inseminación dependen en gran medida de factores ajenos a la propia metodología de aplicación seminal (factores individuales de la oveja inseminada –edad, condición corporal, estado productivo, etc.-, de rebaño –manejo, sanidad, alimentación, etc.-, factores ambientales y otros). Estos factores son muy difíciles de controlar y modificar, por lo que su profundo conocimiento es indispensable, dada la repercusión que presentan sobre los índices de fertilidad de las hembras inseminadas (Abrog et al 2000a y 2000b, Windsor 1995 y 1997). A continuación se exponen en forma de gráficas/tablas parte de un estudio que sobre estos factores se realizó en la oveja churra.

Fertilidad (%) de la inseminación artificial ovina en función de la explotación

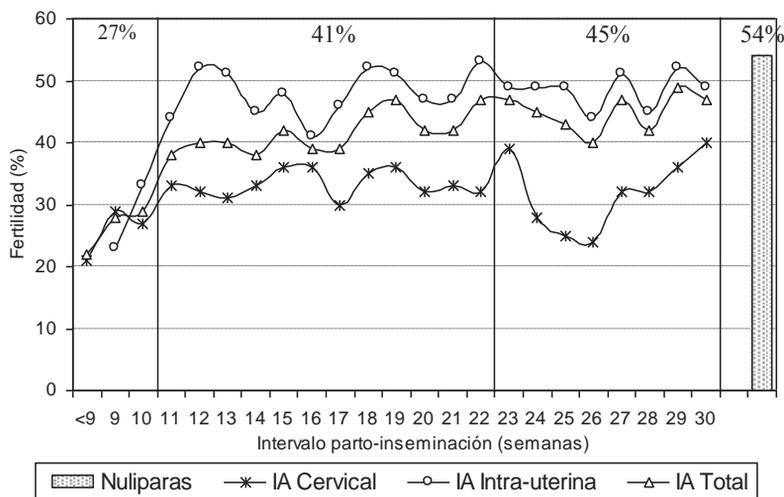


Epoca del año	IA Cervical		IA Intra-uterina	
	n	Fertilidad (%)	n	Fertilidad (%)
▪ P1 : de septiembre a enero	5 125	35,53	11 379	46,88
▪ P2 : de febrero a abril	4 649	28,22	5 808	42,20
▪ P3 : de mayo a junio	7 320	30,79	8 015	45,23
▪ P4 : de julio a agosto	537	22,72	1 615	38,95

Fertilidad (%) de la inseminación artificial ovina en función de la época del año



Fertilidad (%) de la inseminación artificial ovina en función de la edad de la oveja



Fertilidad (%) de la inseminación artificial ovina en función del intervalo parto-inseminación

En resumen, la inseminación intrauterina mediante laparoscopia en la oveja, es una técnica perfectamente aplicable a nivel explotación. Permite una buena cadencia de trabajo (20-40 ovejas por hora), ausencia casi total de efectos secundarios, y una menor variabilidad de resultados, frente a la inseminación cervical. Aunque debemos admitir que el manejo de las ovejas es más laborioso y el equipamiento necesario para su realización es un tanto complejo y costoso, su rentabilidad deriva no sólo de los buenos resultados que con ella se obtienen, si no del hecho fundamental (en cuanto a rentabilidad de sementales y mejora de selección) de poder emplear el semen descongelado.

Bibliografía

- Abroug B. (2000)a. Les facteurs de variation des résultats de l'insemination artificielle chez la race ovine Churra. Thèse de Master of Science Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, España.
- Abroug B., Anel E., Kaabi M., Boixo J. C., Álvarez M., De la Fuente L. F., Chamorro C. y Anel L. (2000)b. Post-insemination fertility in Churra ewe; Factors of variation. *14th International Congress on Animal Reproduction, 15:15; Stockholm-2000.*
- Ali, S.B.A. and Tischner, M. (1988). Freezing ram semen in aluminium packets and deep cervical insemination of ewes with a modified pipette. *In Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. and AI. Dublin. Vol. 2: 219-221.*
- Andersen, K.B. and Aamdal, J. (1991). Artificial Insemination with frozen semen in ewes at different times of the breeding season. *Reprod. dom. Anim., 26:27-30.*
- Álvarez, M., Anel, E., Chamorro, C., Boixo, J.C., García, C., de Paz, P., Carbajo, M. and Anel, L. (1994a). Tipología del orificio uterino externo en la oveja Churra. *In Proc. 7^{as} Jor. Int. Reprod. Anim. e I.A. Murcia. España.*
- Álvarez, M., Anel, E., Chamorro, C., Carbajo, M., Olmedo, J.A., Domínguez, J.C. and Anel, L. (1994b). Relación entre el tipo de orificio uterino externo y el grado de penetración de la pipeta de inseminación en la oveja Churra. *In Proc. 7^{as} Jor. Int. Reprod. Anim. e I.A. Murcia. España.*
- Álvarez M., Anel L., Anel E., Boixo J. C., Chamorro C. y Domínguez J. C. (1996). Inseminación artificial ovina (vía vaginal): Variación de fertilidad en función del lugar de aplicación de la dosis seminal. *XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia SEOC, Logroño, España; 395-399.*
- Álvarez M. (2000). Estudio del cuello uterino en la oveja Churra como método de mejora de la vía vaginal en la inseminación artificial. *Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León-España.*
- Álvarez M., Kaabi M., Boixo J.C., Anel E., Chamorro C.A., Martínez S., García C., y Anel L. (2001). Valoración morfométrica del canal cervical de la oveja mediante imágenes de resonancia magnética. *IX Jornadas sobre Producción Animal de la Asociación Interprofesional para el desarrollo Agrario (AIDA) Zaragoza- España. ITEA (Información Técnica Económica Agraria); Vol. Extra 22(2): 856-858.*

- Anel, L.; Paz, P.; Álvarez, M.; Chamorro, C.; Boixo, J.C.; Manso, A.; González, M.; Kaabi, M. y Anel, E. (2003). Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, 60 (7): 1293-1308.
- Anel, L., Boixo, J.C., Anel, E., Carbajo, M., Domínguez, J.C., Olmedo, J.A., Álvarez, M., Chamorro, C. and de Paz, P. (1992a). Inseminación intrauterina (Laparoscopia) en ovejas: resultados preliminares de su aplicación en condiciones de campo. *In Proc. 6th Jor. Int. Reprod. Anim. e IA.* Salamanca. España. Vol 1: 354-359.
- Anel, L., Boixo, J.C., Anel, E., Carbajo, M., Domínguez, J.C., Olmedo, J.A., Anel, L., Boixo, J.C., Anel, E., Carbajo, M., Domínguez, J.C., Olmedo, J.A. y Melcón, C. (1992b). Fertility of churra ewes following intrauterine insemination by laparoscopy with frozen-thawed semen. *In Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod. and A.I. The Hague. The Netherlands*. Vol. 3: 1384-1386.
- Anel, E., Manso, A., Anel, L., Boixo, J.C., Álvarez, M., Domínguez, J.C. and Carbajo M. (1993). Ensayo de tres metodologías para la congelación de semen de morueco. *In Proc. V Jornadas sobre reproducción Animal. I.T.E.A.* Zaragoza. España. Vol II: 495-497.
- Anel, E. (1993). Comunicación personal.
- Anel, L., Boixo, J.C., Anel, E., Carbajo, M., Olmedo, J.A., Domínguez, J.C. and Chamorro, C. (1994). Empleo de bajas concentraciones espermáticas en la inseminación intrauterina (vía laparoscópica) en la oveja. *In Proc. 7th Jor. Int. Reprod. Anim. e IA.* Murcia. España.
- Campbell J. W., Harvey T. G., McDonald M. F. y Sparksman R. I. (1996). Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*; 45(8): 1535-1544.
- Anel L., Carbajo M., Domínguez J. C., Anel E., Boixo J. C., Chamorro C., Paz P. y Olmedo J. A. (1995). Técnicas de aplicación seminal en la inseminación artificial ovina. *Ovis*; 36: 63-81.
- Anel L., Álvarez M., Anel E., Rodríguez C., Kaabi M., Boixo J. C., Chamorro C. y Paz P. (2001). Effect of pre-freezing dilution rate on quality and fertility of ram thawed semen. *5th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Vienna-Austria*; 49-50.
- Ataman M. B., Kaya A., Yildiz C. y Duzgun H. (2000). The effect of Misoprostol and Valetamate bromide administered before insemination with frozen-thawed semen on cervix dilatation and fertility in sheep. *Indian Vet.J.*; 77(7): 600-602.
- Audicana L., Aughey E. y O'Shaughnessy P. J. (1998). Sensitivity of the early luteal phase ovine cervix to prostaglandin E2 (PGE2) and expression of EP3 receptor mRNA. *Research in Veterinary Science*; 64(2): 177-179.
- Cappai P., Sanna S. R., Branca A., Fraghi A. y Bomboi G. (1998). Comparison of laparoscopic and transcervical insemination with frozen semen in Sarda dairy ewes. *Animal Science*; 66(2): 369-373.
- Barone, R. (1978). *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques*. Tome III: Splanchnologie, Foetus et ses Annexes. Edit.: Laboratoire d'Anatomie. Ecole Vétérinaire. Lyon.
- Barry D.M., van Niekerk, C.H., Rust, J. and van der Walt, T. (1990). Cervical embryo collection in sheep after "Ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. *Theriogenology*, 33: 190
- Berg, K.A. and Aamdal, J. (1991). Artificial insemination with frozen semen in ewes at different times of the breeding season. *Reprod. Anim. Dom.* 26: 27-30.
- Brice, G. and Jardon, C. (1991). L'inseminación intrauterina. La formule 1 de la fécondation. *PATRE*, 384: 40-44.
- Bunch, T.D., Ellsworth, H.S. (1981). Gross anatomy of the ovine cervix. *Int. Goat and Sheep Res.* 1: 282-285.
- Chamorro, C., Álvarez, M., Costilla, S., García, C., de Paz, P., Carbajo, M., Anel, L., Domínguez, J.C. and Fernández, J.G. (1994c). Resonancia Nuclear Magnética del cuerno uterino de la oveja. *In Proc. 7th Jor. Int. Reprod. Anim. e IA.* Murcia. España.
- Colas, G., Tryer, M., Guerin, Y. and Aguer, D. (1980). Fertilizing ability of ram sperm stored in a liquid state during 24 hours. *In Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. and A.I.* Madrid. España. Vol 3: 315.
- Colas, G. (1981). Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. II. Fécondance: relation avec les critères qualitatifs observés *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.* 21: 399-407.
- Coonrod, S.A., Coren, B.R., McBride, B.L., Bowen, M.J. and Kraemer, D.C. (1986). Successful non-surgical collection of ovine embryos. *Theriogenology*, 25: 149.
- Davis, I.F., Kerton, D.J., McPhee, S.R., White, M.B., Banfield, J.C. and Cahill, L.P. (1984). Uterine artificial insemination of ewes. *In Reproduction in Sheep*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp: 303-305.
- Findlater, R.C.F., Harresing, W., Curnock, R.M. and Beck, N.F.G. (1988). Effect of timing of intrauterine insemination with frozen-thawed semen on fertility in ewes. *In Proc. 11th Int. Cong. on anim. Reprod. and A.I.* Dublin. Ireland. Vol 3: 242.
- Findlater, R.C.F., Haresing, E., Curnock, R.M. and Beck, N.F.G. (1991). Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen: effects of time of insemination and semen dose on conception rates. *Anim. Prod.*, 53: 89-96.
- Fiser, P.S.; Ainsworth, L. and Fairful, R.W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28 (5):599-607.
- Folch, J. (1987). La Inseminación Artificial Ovina en España: Estado actual y perspectivas. *Proc. V Jorn. Tec. Gand. Ov.* pp 7-14.
- Fukui, Y. and Roberts, E.M. (1978). Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*, 10 (5): 381-393.
- Gourley, d.d. and Riese, R.L. (1990). Laparoscopic artificial insemination in sheep. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 6 (3): 615-633.
- Greyling J. P. C., Erasmus J. A., Taylor G. J., Merwe S. van-der y Van der Merwe S. (1997). Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Ruminant Research*; 26(1-2): 137-143.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S. and Buckereil, B.C. (1990a). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, 33: 977-992.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S. and Buckereil, B.C. (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33 (5): 993-1010.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Sharpe, P. and Buckereil, B.C. (1990c). Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33(6): 1231-1243.
- Hawk, H.W.; Cooper, B.S. and Pursel, V.G. (1981). Increase sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrous with prostaglandin or progestagen. *J. Anim. Sci.*, 52: 601.
- Hunter, R.H.F. and Nichol, R. (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J. Exp. Zool.* 228: 121-128.
- Killen, I.D. and Caffery, G.J. (1982). Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Aust. Vet. J.*, 59: 95.
- López, A., Tirados, C. and Navarro, M.A. (1987). Valoración del progestágeno en relación con los resultados de la Inseminación Artificial sistemática en ganado ovino. *Proc. V Jor. Tec. Gan. Ov.*, Expoaviga, pp. 32-33.
- López, A. (1992). Inseminación Artificial intrauterina con semen congelado en la oveja. *ITEA 88A*, nº1: 70-75.

- McKelvey, W.A.C.; Robinson, J.J. and Aitken, R.P. (1985). The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24 (5): 519-535.
- Maxwell, W.M.C., Wilson, H.R. and Butler, L.C. (1984). Fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen semen. *Anim. Prod. Aust.*, 15: 448-451.
- Maxwell, W.M.C. and Butler, L.C. (1984). Fertility of ewes following intrauterine insemination using a laparoscope compared with other methods. *Proc. 4th Conf. Aust. Assoc. Anim. Bred. and Gent.* pp. 192-193.
- Maxweel, W.H.C. and Hewitt, L.J. (1986). A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *J. Agric. Sci.*, 106: 191-196.
- Maxweel, W.H.C. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10 (4) 301-308.
- Montoro, V. (1993). Comunicación personal.
- More, J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: New insights. *Acta Anat.*, 120: 156-159.
- Mylne, M.J.A., McKelvey, W.A.C., Fernie, K. and Matthews, K (1992). Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. *Vet. Rec.*, 130: 450-451.
- Naqvi S. M. K., Joshi A., Bag S., Pareek S. R. y Mittal J. P. (1998). Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. *Small Ruminant Research*; 29(3): 329-333.
- Nikolov I., Nestorova J., Hristov M., Ivanova N. y Khristov M. (1997). The effect of the frequency of insemination and the depth of semen application on the conception rate of ewes. *Biotehnologija u Stocarstvu*; 13(5-6): 397-401.
- Quinlivan, T.D. and Robinson, T.J. (1967). The number of the spermatozoa in the fallopian tubes after artificial insemination following withdrawal of Sc-9880 impregnated intravaginal sponges. In: the control of the ovarian cycle in the sheep. Edt. by T.J. Robinson. Sidney Univ. Press pp 177-184.
- von Reinhold, G., Rommel, W. and Schulz, J. (1987). Studies on anatomic structure of uterine cervix of Merino sheep under the aspect of artificial insemination. *Mh. Vet. Med.*, 42: 364-368.
- Salamon S. y Maxwell W. M. C. (1995)a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*; 37(3-4): 185-249.
- Salamon S. y Maxwell W. M. C. (1995)b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*; 38(1-2): 1-36.
- Salamon S. y Maxwell W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*; 62: 77-111.
- Tanekata, S.; Fukui, Y. and Ono, H. (1985). Intrauterine insemination with frozen semen in the ewe using a laparoscope. *Jap. J. Anim. Rprod.* 31(1):25-27.
- Urarte, E. (1993). Comunicación personal.
- Vallet, J.C., Cassou, B., Despierres, E. and Koymdjiev, S. (1988). Practical method of improving the use of frozen ram semen by intrauterine insemination under laparoscopic control. In *Proc. 11th Int. Cong. on Anim. Reprod. and A.I.* Dublin. Ireland. Vol 3: 303-304.
- Windsor D. P. (1995). Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. *Theriogenology*; 43(6): 1009-1018.
- Windsor D. P. (1997). Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. *Animal Reproduction Science*; 47(1-2): 21-29.

EVOLUCIÓN DE UN PROGRAMA DE INSEMINACIÓN EN LA RAZA ASSAF EN LA PROVINCIA DE LEÓN

¹Álvarez, M., ³Martínez-Pastor, F., ²Paz, P., ¹Gomes-Alves, S., ¹López-Urueña, E., ⁴Rodríguez, J., ⁴Aparicio, N., ¹Nicolás, M., ¹Mata-Campuzano, M., ¹Anel, L.,
1Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria. 2Departamento de Biología Molecular. ITRA-ULE. Universidad de León. 3INDEGSAL, Universidad de León. 4COVISURLE.

INTRODUCCIÓN

La raza Assaf, recientemente incluida en "catálogo oficial de razas de ganado de España" bajo el epígrafe de razas de terceros países (Orden APA/2420/2003, de 28 de Agosto), tiene una gran difusión en Castilla y León debido a sus buenas características lecheras y a su adaptación a las condiciones de manejo en sistemas de producción intensivos o semintensivos. Se trata de una raza sintética (AwassixMilschaf) originaria de Israel que se introdujo en España en los años 70. En la provincia de León, donde existen censos muy elevados (155.000 cabezas), existe un gran interés en la mejora de la raza Assaf, lo que llevó a la Diputación de León a promover y financiar un programa de selección y mejora genética en el año 1998. La Diputación de León mantiene el Centro de sementales (Finca "El Toralino", San Pedro Bercianos) y colabora con la Asociación de ganaderos de León y la Asociación nacional de ganaderos (ASSAFE) así como con otros organismos, como la Unidad de Reproducción Animal de la Universidad de León y el INIA para la ejecución de dicho programa.

La inseminación artificial es una herramienta esencial en los programas de mejora genética ya que permite el intercambio y difusión de material genético de los sementales (ya sea en periodo de prueba o como mejorantes) en diferentes explotaciones en condiciones sanitarias óptimas.

En este trabajo mostramos algunos aspectos de la evolución del programa de inseminación dentro del programa de mejora genética, aportando, por una parte, datos de la gestión del centro de sementales (eficacia de recogida seminal y valoración seminal básica) y, por otro, los resultados de fertilidad.

MATERIAL Y METODOS

En este estudio se utilizaron moruecos de raza Assaf de edades comprendidas entre 1-6 años adiestrados a la recogida seminal mediante vagina artificial. El régimen sexual osciló entre 4-6 saltos/semana. Los eyaculados se recogieron en un tubo colector, mediante vagina artificial termorregulada. Después de la recogida se mantuvieron en un baño a 37°C mientras se realizaban las pruebas de valoración: volumen (en colector graduado), motilidad masal (MM: gota sobre porta, $\times 40$, escala de 0-5), concentración (espectrofotómetro, dilución 1/400 en citrato sódico); MI (gota plana, $\times 100$). Los eyaculados considerados válidos (3000×10^6 spz/ml, Vol: mayor o igual a 0,5 mL; MM mayor o igual a 4; MI: mayor o igual a 60%) se diluyeron con Tris-cítrico+fructosa a los 10 minutos de la recogida hasta obtener una concentración final de 1600×10^6 spzs/mL. El semen se refrigeró hasta 15°C, momento en el que se envasó en pajuelas de 0,25 mL, que se mantuvieron a 15°C hasta el momento de la inseminación artificial (IA).

Las hembras (ovejas y corderas) se sincronizaron con esponjas intravaginales (40 mg FGA) durante 14 días y eCG vía intramuscular (400-500 UI en el momento de retirada de esponjas). Las dosis seminales se aplicaron por vía vaginal utilizando un catéter recto, 55 ± 1 h tras la retirada del progestágeno. El control de resultados se realizó mediante porcentaje de ovejas paridas respecto a ovejas inseminadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gestión del Centro de sementales: El número de machos incorporados al centro entre los años 2002 y 2008 ha sido estable, a excepción del año 2007, en que no se introdujeron machos debido a las rígidas restricciones sanitarias (BOCYL nº 74, 17 de abril de 2007). En total, se han introducido 203 machos en el centro (mediana: 33), con 24 ganaderías colaboradoras en total (mediana: 14). El porcentaje de aprendizaje de los machos a la recogida seminal en vagina artificial osciló entre el 65% y 83% en el periodo 2002-2008, no obstante se observaron variaciones que están relacionadas con la edad de los machos en el entrenamiento, época del año, tamaño de lote, etc. Algunos autores, utilizando melatonina en la raza Latxa (Beltrán de Heredia et al., 1998) o en la Manchega (Alcaide et al., 2001) observaron menores rendimientos del entrenamiento.

El registro de recogidas seminales aparece resumido en la Tabla 1. Se observa que el número global de extracciones seminales en el 2008 ha disminuido (440) respecto a la tendencia de los años precedentes, lo que está relacionado con la menor demanda de inseminaciones. El porcentaje global de saltos en vagina (número de eyaculaciones respecto al número de intentos de recogida seminal) así como el porcentaje de eyaculados válidos es elevado, lo cual prueba que la eficacia de recogida seminal con machos entrenados es muy alta en todos los años analizados.

Tabla 1. Eficacia en la recogida seminal con vagina artificial en moruecos de raza Assaf.

Año	Nº de intentos de recogidas seminales	Nº eyaculaciones	Nº eyaculados Válidos (%)	Nº de machos utilizados
2002	637	568	535 (94,2)	56
2003	679	461	421 (91,3)	33
2004	501	445	423 (95,1)	41
2005	574	493	458 (92,9)	60
2006	736	674	624 (92,6)	77
2007	597	593	564 (95,1)	65
2008	440	430	410 (95,3%)	38

El volumen y la producción media de espermatozoides en el año 2008 fueron 1,19 mL y 4664×10^6 respectivamente. Un análisis comparado entre años mostró que la producción seminal fue ligeramente superior en los primeros años (2002, 2003 y 2004), con 5321×10^6 espermatozoides, que a partir del 2005 (4667×10^6). La disminución de la producción a partir del año 2005 podría deberse al uso de muchos animales jóvenes, así como al escaso número de machos disponibles, lo que obliga a realizar recogidas más frecuentemente (más importante en el año 2008). Estos parámetros resultan similares a los obtenidos en raza Manchega (vol: 1,09 mL y producción: 4020×10^6 ; Alcaide et al., 2001) o en su variedad negra (vol: 1,01mL y producción: 4121×10^6 espermatozoides, González et al., 1998).

Resultados de Inseminación artificial: El número de inseminaciones realizadas ha aumentado (Tabla 2) desde el inicio del programa de inseminación, alcanzando su máximo en el año 2005; sin embargo, en los años posteriores ha sufrido un ligero descenso.

Tabla 2. Nº de inseminaciones (vía vaginal) y fertilidad (% de partos) por año.

Año	Nº IA totales	Fertilidad (%)	Nº explotaciones
1998	2187	31,7	24
1999	2402	26,0	25
2000	572	34,1	9
2001	2309	35,3	21
2002	4756	40,2	32
2003	4257	39,9	31

2004	5012	40,9	34
2005	5760	35,2	35
2006	5531	33,1	35
2007	5072	38,5	25

La fertilidad en la raza Assaf fue similar a la registrada en la raza Churra (38,11%; Anel et al., 2005); e inferior a la de otras razas (Manchega: 45%-Montoro et al., 2002; Rasa aragonesa: 58,7%- Blasco et al., 2007). Una posible causa de los bajos porcentajes de fertilidad observados en algunas razas, como la Churra y Assaf, es la compleja estructura de su cérvix (Kaabi et al, 2006). Además, la fertilidad post-inseminación está influida por muchos factores: año, época del año, edad de la oveja, macho, explotación, el nº de inseminaciones acumuladas por oveja, el intervalo parto-inseminación, el inseminador, etc (Anel et al., 2005 y Lahoz et al., 2007). En nuestro estudio, observamos un descenso de la fertilidad con la edad de las ovejas, así hasta los 3 años la fertilidad media fue del 40,0% bajando hasta el 36,5% a los 4 años y una media del 27,5% en ovejas de más edad. En la raza Latxa el porcentaje de fertilidad fue mejor en ovejas mayores de dos años y en la raza Churra la mejor fertilidad se obtuvo entre 1,5 y 4,5 años (Anel et al., 2005). La fertilidad es mejor en época favorable (agosto-diciembre) que en la desfavorable (39,4% y 29,1% respectivamente), hecho comprobado ampliamente en otras razas (Anel et al., 2005). En conclusión, los resultados conseguidos en el programa de inseminación en la raza Assaf han sido buenos en cuanto a la eficacia de la recogida seminal (altos porcentajes de entrenamiento y de eyaculados válidos) y se pueden considerar aceptables en cuanto a la fertilidad. Actualmente, el objetivo del programa es la mejora de la fertilidad mediante el control de alguno de los factores de variación, lo cual incrementaría la eficacia del programa de selección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., de la Fuente, L.F. & Paz, P. 2005 *Theriogenology* 63: 1235-1247.
- Alcaide, V., Manso, A., Moyano, J.C., García-Cervigón García-Cervigón, M, Palomares, M.D. & Montoro, V. 2001. Jornadas de la SEOC, Sevilla, 959-964.
- Beltrán de Heredia, I., Arrese, F., Ugarte, E. & Urarte, E. 1998. Jornadas de la SEOC, Vitoria-Gasteiz 531-535.
- Blasco, M.E., Sevilla, E., Folch, J., Lahoz, B., Quintín, F.J., Galeote, A.I., Hernández, M., Fantova, E. & Alabart, J.L. 2007. Jornadas de la SEOC, Mallorca, 317-320. González, M.E., Aguado, M.J., Pérez-Guzmán M.D., Montoro, V., Gil, P. & Garde, J. 1998. *Arch. Zootec.* 47: 329-334.
- Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C. A., Boixo, J.C., de Paz, P. & Anel, L. 2006. *Theriogenology* 66(8): 1876-1983.
- Lahoz, B., Sevilla, E., Folch, J., Blasco, M.E., Quintín, F.J., Galeote, A.I., Hernández, M., Fantova, E. & Alabart, J.L. 2007. Jornadas de la SEOC, Mallorca, 332-334
- Montoro, V., Gallego, R. & Pérez Guzmán, M.D. 2002. Jornadas de la SEOC, Valencia. 1073-1078.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Diputación de León

TITLE: Evolution of insemination programme in Assaf breed.

ABSTRACT: Assaf breed has largely been allocated in Castilla y León and particularly in the province of León. In 1998 a selection and genetic improvement programme was initiated for milk production in 38 flocks. The trained rams in collection of semen using an artificial vagina reach 74% and the percentage of valid ejaculates of the whole collected ones is over 90%. Artificial insemination is a practice which is established in livestock of control group, and fertility results (lambing rates) have fluctuated between 35-40% since the programme was started. Fertility rate drops as the ewe grows older (more than 4 years) and according to the insemination season (a 10% improvement in breeding season).

Keywords: sheep, cervical insemination, semen, ram

**ALGUNAS PUBLICACIONES DEL
GRUPO ITRA-ULE (UNIVERSIDAD DE LEÓN)
RELACIONADAS CON LA
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVINA**

INSEMINACION INTRAUTERINA CON SEMEN DESCONGELADO EN OVEJAS DE RAZA CHURRA. REPERCUSIONES SOBRE EL ESQUEMA DE SELECCION

BOIXO, J.C.¹; ANEL, L.²; ANEL, E.²; CARBAJO, M.²; DOMINGUEZ, J.C.², y OLMEDO, J.A.³

¹Junta de Castilla y León. CENSYRA. León. ³Diputación de Valladolid

²Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León

INTRODUCCION

En el esquema orientativo de selección de raza Churra, al igual que en otras razas ovinas de aptitud lechera, tienen lugar tres procesos de selección consecutivos, en los que adquiere gran importancia la Inseminación Artificial (I.A.):

1.- Selección por ascendencia. Las mejores ovejas de la población son cubiertas por I.A. con los mejores carneros probados para obtener los posibles machos a probar (en torno a 900).

2.- Selección individual. Se controla el desarrollo y la conformación hasta el destete (control en explotación) eligiendo los que se consideran aptos (unos 300) para la fase de control de crecimiento, conformación y aptitud para la I.A. (control en centro de machos), pasando a la siguiente fase los animales que cumplan los mínimos exigidos (en torno a 100), siendo eliminados gran parte por su inaptitud para la I.A.

3.- Selección por descendencia. Se trata de valorar al macho en función de los controles de producción lechera de al menos 20 hijas de cada macho, obtenidas en al menos 4 explotaciones mediante I.A. Los machos probados mejorantes se difunden mediante I.A.

Los esquemas de selección en razas ovinas lecheras no han tenido el mismo desarrollo que en otras especies, debido en gran parte a la escasa rentabilidad de la I.A., condicionada sobre todo a la no disponibilidad de semen congelado con aceptables resultados de fertilidad.

La disponibilidad de un método de campo para la aplicación de semen congelado en ovino, tal como la I.A. intrauterina (I.A.I.U.), puede suponer cambios importantes en los esquemas de selección de ganado ovino lechero, basados actualmente en la I.A. cervical (I.A.C.) con semen refrigerado (CARRIEDO y SAN PRIMITIVO, 1989).

MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se han incluido las inseminaciones intrauterinas con semen descongelado realizadas durante el período comprendido desde septiembre de 1991 hasta mayo de 1992, así como aquellas inseminaciones por vía cervical con semen refrigerado correspondientes al mismo período realizadas en las explotaciones anteriores, todo ello dentro del esquema de selección de la raza Churra.

El cálculo de los porcentajes de fertilidad se ha hecho en función exclusivamente de los partos, para hacer comparables los datos de la I.A. intrauterina con los de la I.A. cervical, ya que en esta última no se disponía de confirmación de gestación por ecografía post-inseminación.

El desarrollo actual de la técnica de la I.A.I.U. permite un rendimiento por inseminador de al menos 30 ovejas a la hora, ya que el tiempo empleado en la inseminación de una oveja, ya dispuesta sobre la camilla o noria, es como media 1,5 minutos. El inseminador precisa un ayudante para la carga de inyectores si el semen viene en pajuelas individuales. Con sistemas dosificadores múltiples podría prescindirse del ayudante.

RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados comparativos entre I.A. cervical e intrauterina.

En el cuadro siguiente se muestran los resultados de las dos técnicas de inseminación, en diversas épocas del año, señalando el número total de ovejas inseminadas y la fertilidad obtenida. Los resultados de I.A. intrauterina corresponden a la fase de desarrollo de la técnica a nivel de campo (ANEL et al., 1992), por lo que son esperables resultados algo superiores en el futuro. Todos los datos son preliminares, a falta de una depuración completa de los mismos. Asimismo, al tratarse de datos parciales no pueden considerarse como resultados generales de fertilidad de las técnicas en esta raza, aunque sí orientativos.

	Otoño-91		Invierno-91/92		Primavera-92		TOTAL	
	Núm	% Fert.	Núm	% Fert.	Núm	% Fert.	Núm	% Fert.
I.A.I.U.	639	60,9	867	52,7	833	60,7	2339	57,8
I.A.C.	463	26,3	268	19,8	466	28,5	1197	25,7

Repercusiones sobre el Centro de Machos.

Un primer efecto del uso de la I.A. intrauterina se manifiesta claramente en el funcionamiento y dimensionado del Centro de machos.

I.A. cervical: Los machos deben ser necesariamente propiedad del esquema de valoración, lo cual puede suponer que determinados machos, normalmente los mejor valorados por progenie, no sean cedidos por sus dueños. Los machos deben comprarse con 2 o 3 meses incorporándose al Centro de Machos. Permanecen en el Centro hasta la publicación de los resultados de valoración, utilizándose posteriormente los mejorantes de forma intensiva. Existe por tanto el riesgo de que cuando se conozca la prueba de un macho mejorante dicho macho haya muerto o no sea apto para I.A., con lo cual se habrá perdido el esfuerzo previo.

I.A. intrauterina: Los machos pertenecen a los ganaderos, utilizándolos el Centro de machos únicamente para congelar las dosis necesarias tanto para su valoración (unas 70) como para inseminaciones posteriores en caso de que resulte mejorante (unas 5.000, que si no resulta mejorante se destruyen). Los machos pueden incorporarse al Centro jóvenes o ya con edad suficiente para la recogida seminal, en cuyo caso al menos 100 de ellos no se incorporarían al Centro al ser manifiestos los defectos de crecimiento y conformación. Los 200 machos se incorporarían en todo caso durante tres meses para la elaboración de las 5.000 dosis seminales.

Dimensionado del Centro de Machos con I.A. cervical:

- 300 machos jóvenes al año durante un año 300
- 100 machos en espera de valoración durante 2,5 años 250
- 20 machos mejorantes durante 3 años 60
- TOTAL 610

Dimensionado del Centro de Machos con I.A. intrauterina:

- A) Con recría y valoración de machos jóvenes en el Centro:
 - 300 machos jóvenes al año durante un año 300
 - 100 machos en espera de valoración durante 0 años .0
 - 20 machos mejorantes durante 0 años0
 - TOTAL 300
- B) Con recría y valoración de machos jóvenes en granja:
 - 200 machos jóvenes al año en cuatro fases de 3 meses 75
 - 100 machos en espera de valoración durante 0 años .0
 - 20 machos mejorantes durante 0 años0
 - TOTAL 75

Repercusiones sobre el coste de inseminación.

I.A. cervical: El coste por **dosis seminal** se eleva por una parte al aumentar los costes de mano de obra al ser menor el número de dosis elaboradas por doble eyaculado (unas 20 dosis de 400 mill. de spz), pudiendo fijar un coste final aproximado de unas 100 pts. La **aplicación** de las dosis seminales tiene un bajo coste, al

aplicarse por vía cervical mediante un equipo sencillo, constituyendo el coste principal el tiempo invertido por el técnico. Esto representa un coste por oveja inseminada de 15.000(media jornada)/100(ovejas) + 650(sincronización) = 800 pts/oveja.

Coste final aprox. por oveja inseminada: 100 + 800 = 900 pts.

I.A. intrauterina: El coste por **dosis seminal** se eleva por una parte debido a los costes de amortización del equipo de congelación y por los gastos de nitrógeno para congelación y conservación, pero se abarata en cuanto a gastos de mano de obra al ser mayor el número de dosis elaboradas por doble eyaculado (unas 400 dosis de 20 mill. de spz), pudiendo fijar un coste final aproximado de unas 200 pts por dosis. La **aplicación** de las dosis seminales se ve repercutida por el coste de amortización de los equipos (precio de adquisición en torno al millón de pesetas), vaina de inyección, más el tiempo invertido por el técnico y el ayudante. Esto representa un coste por oveja inseminada de 25.000/100 + 100(amortización) + 180(vaina) + 650(sincronización) = 1.180 pts/oveja.

Coste final aprox. por oveja: 200 + 1.180 = 1.380 pts.

Coste por macho probado.

Para probar un macho es preciso controlar la producción de al menos 20 ovejas. Puede considerarse una prolificidad de 1,4 (compensada por eliminación por defectos fenotípicos, muertes, ovejas no controladas e imprevistos), una relación machos/hembras de 0,5, y una fertilidad distinta entre I.A. intrauterina (60 %) y cervical (30 %). De acuerdo con los factores anteriores el número de ovejas a inseminar para obtener 20 hijas controladas serían:

I.A.C.: 133 ovejas * 0,3 fert * 0,5 m/h = 20 hijas

I.A.I.U.: 67 ovejas * 0,6 fert * 0,5 m/h = 20 hijas

En consecuencia, el coste de las inseminaciones a efectuar para valorar un macho sería:

Prueba por I.A.C.: 133 ovejas * 900 = 119.700 pts/macho

Prueba por I.A.I.U.: 67 ovejas * 1.380 = 92.460 pts/macho

Conclusiones.

La técnica de la I.A.I.U. con semen congelado constituye una alternativa más rentable que la I.A.C. con semen refrigerado, en las condiciones actuales del esquema de selección de la raza Churra, teniendo la I.A.I.U. sobre la I.A.C. las siguientes ventajas económicas, genéticas y de manejo:

- El coste total de las inseminaciones a efectuar para valorar un macho es mucho menor, necesiéndose menos ovejas.
- El dimensionado del Centro de Machos, y por lo tanto el coste de amortización y funcionamiento, es mucho menor.
- No se corren riesgos de muerte o inutilización de un macho desde su prueba hasta la posible utilización del mismo, al tener dosis congeladas, por lo que nunca se perdería el trabajo de valoración previo.
- Puede programarse con mucha mejor precisión la prueba de los machos, al estar disponibles dosis de todos ellos en toda posible inseminación.
- La fertilidad es mucho más alta, con menor número de ovejas vacías tras la I.A. y monta natural al ciclo estral subsiguiente. Este hecho es especialmente importante en contra-estación, cuando se corre el riesgo de que no se presente el segundo ciclo post-sincronización.
- La difusión posible de un macho mejorante de alta calidad es mucho mayor que a través de la I.A.C., permitiendo disponer en el momento de la inseminación de dosis de todos los machos mejorantes.

BIBLIOGRAFIA

CARRIEDO, J.A. y SAN PRIMITIVO, F. (1989) Mejora genética de la producción láctea. Ovis 3:53-77.
ANEL, L; BOIXO, J.C.; ANEL, E.; CARBAJO, M.; DOMINGUEZ, J.C.; OLMEDO, J.A. and MELCON, C. (1992) Fertility of churra ewes following intrauterine insemination by laparoscopy with frozen-thawed semen. Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I. The Hague. The Netherlands Vol 3:1384-1386.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVINA (VIA VAGINAL): VARIACIONES DE FERTILIDAD EN FUNCIÓN DEL LUGAR DE APLICACIÓN DE LA DOSIS SEMINAL.

Alvarez, M.*; Anel, L.*; Anel, E.***; Boixo, J.C.****; Chamorro, C.*****; Domínguez, J.C.*

*Reproducción animal: Universidad de León ***ANCHE *****Biología Celular y Anatomía:
Universidad de León ****CENSYRA

RESUMEN-El objetivo de esta experiencia es analizar los resultados de fertilidad en la inseminación cervical en función de dos parámetros: la profundidad de deposición del semen en el interior del cérvix y el reflujo de la dosis seminal hacia la vagina. Para la sincronización e inducción del celo se utilizan esponjas intravaginales de 30 mg de FGA durante 12 días y 500 UI de PMSG en la retirada del progestágeno. Se inseminan 1506 ovejas con semen refrigerado a 15°C y se clasifica la profundidad de inserción del catéter según una escala que va de 0 a 4. El resultado de este trabajo demuestra que la fertilidad se eleva según aumenta la profundidad. La fertilidad media obtenida es 31.6 %. Los porcentajes de fertilidad varían desde 10.9 cuando la inseminación es ciega hasta 44.8 cuando la dosis queda dentro del cérvix o el reflujo hacia la vagina es mínimo.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por Junta de Castilla y León (LE 1-7-92) y ANCHE.

INTRODUCCIÓN-El estudio de las condiciones locales del cuello uterino y de la vagina suponen una nueva estrategia para mejorar los resultados de fertilidad en la inseminación artificial por vía vaginal. La principal causa de los poco afortunados resultados de fertilidad obtenidos en la inseminación cervical radica en la complicada estructura del cuello uterino. El cérvix consta de 4 o 5 anillos excéntricos entre sí (Moré, 1981) que impiden el paso del catéter hasta el útero. Estos anillos son de un tejido fibroso y muscular y apenas se dilatan en el celo. El principal problema que surge al intentar penetrar el cérvix con un catéter rígido, es el posible daño que se puede ocasionar, con la subsiguiente inflamación y disminución de la fertilidad. Por todo ello, en este estudio, la penetración del cérvix se realiza evitando lesionar los tejidos cervicales.

MATERIAL Y METODOS-Los tipos de penetrabilidad se clasifican en un rango de 0 a 4, correspondiendo cada uno de ellos a lo siguiente:

- 0-Inseminación ciega.
- 1-Inseminación sobre el orificio uterino externo (OUE).
- 2-Ligera penetración en el OUE (aproximadamente 0.5 cm) pero con reflujo total de la dosis hacia la vagina.
- 3-Penetración ligera del catéter (aproximadamente 0.5 cm) pero sin reflujo o con ligero reflujo de la dosis.
- 4- Penetración del catéter en el útero, toda la dosis seminal queda en el útero.

Un total de 1506 ovejas de raza Churra fueron sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización del celo mediante esponjas intravaginales (FGA, 30mg) durante 12 días y 500 UI de PMSG a la retirada de las mismas. Para llevar a cabo la inseminación artificial, a las 56 ± 1h de la retirada del progestágeno, se utiliza una pipeta recta y se intenta avanzar la máxima distancia dentro del cuello uterino sin provocar lesiones. El semen, diluido en leche descremada, se mantiene refrigerado a 15°C hasta el momento de su aplicación. Cada dosis contiene 400 10⁶ espermatozoides y un volumen de 0.25ml.

RESULTADOS Y DISCUSION-El análisis estadístico conjunto muestra que existen diferencias altamente significativas entre los distintos grados de penetración del catéter y la fertilidad ($p \leq 0.001$). La fertilidad obtenida para los tipos de penetración 0, 1, 2, 3 y 4 es de 10.9, 28.5, 29.8, 44.8 y 20% respectivamente(Tabla 1). La fertilidad global media es del 31,7%.

Tabla 1. Relación entre el grado de penetración y la fertilidad.

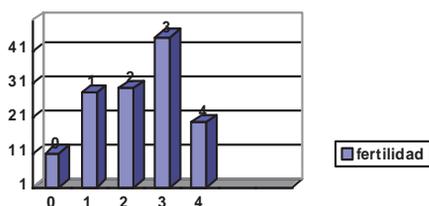
penetración	n	%	fertilidad (%)
0	64	4.2	10.9 ^b

1	407	27	28.5 ^a
2	729	48.4	29.8 ^a
3	301	20	44.8 ^c
4	5	0.3	20.0 ^{abc}

a-c, en una columna valores con distinto superíndice son estadísticamente significativos ($p < 0,001$)

Se advierte una elevación de la fertilidad según se deposita la dosis más profundamente en el interior del canal. Así, el mejor resultado de fertilidad (44,8%) se obtiene en el tipo 3, con diferencias significativas ($p \leq 0.001$) con el resto de los tipos y superior a la penetración 4 (20%), aunque ésta no es significativa por el escaso número de ovejas en que se logra (0,3%). Gráfico 1.

Gráfico 1. Relación entre fertilidad y penetración cervical.



Otros autores han obtenido resultados similares, por ejemplo, Epleston (1994) relaciona positivamente la penetración del catéter con la fertilidad y, así encuentra que existe un incremento lineal de la fertilidad según se profundiza en el cérvix (6.6 a 12.2 puntos por cada cm que la pipeta pasa del *cervical os*). Sólo en el 8% de las ovejas el catéter pasa más allá de 3 cm, lo que se aproxima a nuestros resultados.

Por otro lado, Windsor (1994) realiza una clasificación parecida, pero consigue llegar al útero en un 76% de las ovejas, con la ayuda de un técnico experimentado. Sin embargo, encuentra una fertilidad del 26%, superior a la hallada en la inseminación cervical (9%), teniendo en cuenta que utiliza semen congelado en su experiencia. En cuanto a la penetrabilidad del cérvix, Halbert (1990) consigue el paso al útero en el 82% de las hembras, pero bajo unas condiciones especiales, tanto en la posición de la oveja como del instrumento utilizado.

CONCLUSIONES-Según los resultados expuestos, podemos concluir que el lograr introducir la dosis seminal lo más profundamente en el cérvix de la oveja, siempre y cuando no sea traumático, conduce a una mejora significativa de la fertilidad.

BIBLIOGRAFIA

- EPPLESTON, J.; SALAMON, S.; MOORE, N. W.; EVANS, G.(1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* 36:211-225.
- WINDSOR, D.P.; SZELL, A.Z.; BUSCHBECK, C. EDWARD, A.Y.; MILTON, J.T.B.; BUCKRELL, B.C. (1994). Transcervical artificial insemination of australian merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42:147-157.
- HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTON, J. S.; BUCKERELL, B. C. (1990). A tecnique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology* 33: 993-1010.
- MORÉ, J. (1984). Anatomy and Histology of the Cervix uteri of the ewe: New Insights. *Acta Anat.* 120: 156-159.

COMPARACION DE TRES DILUYENTES PARA REFRIGERACIÓN DE SEMEN DE MORUECO A 15°C. RESULTADOS DE FERTILIDAD.

Anel, E.* ; Anel, L.** ; Boixo, J.C.*** ; Alvarez, M.** ; Sevillano, C.**

*ANCHE **Reproducción Animal: Universidad de León ***CENSYRA

RESUMEN.

En este trabajo se estudian los efectos que sobre la fertilidad tiene el empleo de tres diluyentes basados en leche descremada, tris-ácido cítrico y tes-tris respectivamente. Se inseminan un total de 1543 ovejas de raza Churra que han sido sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización del celo mediante la aplicación de esponjas intravaginales con 30 mg de FGA durante 12 días y la inyección de 500 UI de PMSG en el momento de la retirada de las esponjas. A cada oveja se le aplica una dosis de 400×10^6 espermatozoides por vía vaginal a las 56 ± 1 h de la retirada de las esponjas.

El resultado global de fertilidad de la experiencia es del 35,1%, mientras que se obtiene un 33,1%, un 37,1% y un 35,2% respectivamente para los diluyentes basados en leche descremada, tris-ácido cítrico y tes-tris. El análisis estadístico de estos resultados no revela diferencias significativas entre los tres diluyentes por lo que se refiere a sus resultados de fertilidad.

INTRODUCCIÓN.

Durante los últimos años se han realizado diversos estudios con la finalidad de conseguir ajustar la técnica de inseminación artificial por vía vaginal en la raza Churra, en la cual los resultados de fertilidad que se obtienen con este tipo de inseminación son relativamente bajos.

En la inseminación artificial ovina con semen refrigerado se utilizan, mayoritariamente, diluyentes a base de leche descremada y, en menor medida, diluyentes derivados de los que se emplean para la congelación de semen. Sin embargo algunos de estos diluyentes presentan inconvenientes desde el punto de vista de su elaboración y manejo (Anel et al., 1994).

En esta ocasión realizamos un estudio de los efectos que sobre la fertilidad tiene el empleo de tres diluyentes basados en leche descremada, tris-ácido cítrico y tes-tris respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Los diluyentes empleados en la experiencia son la leche descremada según la fórmula dada por Colas (1989) ligeramente modificada para adaptar el pH a 7, el tris-ac. cítrico-fructosa descrito por Fiser y Fairfull (1989) y el tes-tris-fructosa tal como lo utiliza Anel (1990).

El semen empleado en la experiencia, procedente de machos de raza Churra, se recoge mediante vagina artificial termorregulada a 40° C y, tras ser sometido a una evaluación previa en la que se determina su motilidad en masa, volumen y concentración espermática, los eyaculados considerados como válidos son divididos en tres alicuotas, cada una de las cuales se diluye con uno de los tres diluyentes problema, siendo a continuación refrigerado a 15°C.

Con este semen se inseminan un total de 1543 ovejas de raza Churra que han sido sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización del celo mediante la aplicación de esponjas intravaginales con 30 mg de FGA durante 12 días y la inyección de 500 UI de PMSG en el momento de la retirada de las esponjas. A cada

oveja se le aplica una dosis de 400×10^6 espermatozoides por vía vaginal a las 56 ± 1 h de la retirada de las esponjas.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se analizaron mediante pruebas de Chi cuadrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El resultado global de fertilidad de la experiencia es del 35,1%, mientras que los resultados parciales por tipo de diluyente quedan reflejados en la tabla posterior.

	N	P	Fertilidad (%)
Leche descremada	516	171	33,1
Tris-Ac. cítrico	518	192	37,1
Tes-Tris	509	179	35,2

n: número de hembras inseminadas.

P: número de hembras paridas.

El análisis estadístico de estos resultados no revela diferencias significativas entre los tres diluyentes por lo que se refiere a sus resultados de fertilidad, sin embargo en nuestra opinión el diluyente basado en tris-ácido cítrico tiene ventajas sobre los otros dos, no solo por la mayor fertilidad que obtiene en la prueba, sino porque es bastante más barato que el basado en tes-tris y más fácil de manejar, tanto en su elaboración como en su almacenamiento, que el basado en leche descremada.

BIBLIOGRAFÍA.

ANEL, E. (1990). Inducción experimental de la nucleación en la congelación del semen de morueco: Efectos sobre motilidad, endósmosis celular e integridad acrosómica. Tesina. Universidad de León.

ANEL, E.; OLMEDO, J.A.; ANEL, L.; BOIXO, J.C.; DOMINGUEZ, J.C.; CARBAJO, M. y DE PAZ, P. (1994). Estudio sobre la influencia de la yema de huevo en los diluyentes espermáticos para semen refrigerado (15°C) de morueco. 7^{as} Jorn. Int. Reprod. Anim. e I.A.. Murcia. España. pp.: 290.

COLAS, C. (1979). Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence on the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livestock Production Science* 6: 153-166.

FISER, P.S. and FAIRFULL, R. (1989). The effect of glycerol related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.

ESTUDIO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTOS EN LA OVEJA DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

Boixo, J.C.¹; Anel, L.²; Anel E.³; Alvarez, M.²; Domínguez, J.C.²; Olmedo, J.A.⁴ y Kaabi, M.²
¹CENSYRA Junta de C. y León, ²Reproducción Animal, Universidad de León.
³ANCHE. ⁴Diputación de Valladolid.

RESUMEN

Con el fin de contribuir al estudio de un intervalo mínimo entre la inseminación y la introducción de machos, que abarate costes de manejo de lotes sin que se produzcan confusiones en asignación de paternidades, se ha analizado la distribución de los partos de 2941 ovejas de raza Churra, paridas después de la inseminación, en el período comprendido entre octubre de 1993 a marzo de 1996.

De los partos producidos, 1868 corresponden a ovejas preñadas como consecuencia de la inseminación. Para estas ovejas, con fecha de inicio de gestación conocida, la moda queda establecida en el día 148 post-inseminación. En este día se producen el 18,8 % de los partos. En el intervalo 148 ± 4 días se producen el 94,2 % de los partos, mientras que en los 5 días anteriores a este intervalo se producen el 3,5 % y en los 5 días posteriores el 2,3 %.

El protocolo de manejo reproductivo empleado para las ovejas cuyos partos han sido estudiados en el presente trabajo fija un intervalo entre inseminación e introducción de machos de 14 días. De acuerdo a los resultados observados solamente existen 4 días prácticamente vacíos (5 partos: 0,0017% del total) entre los partos de inseminación y los partos de monta natural.

La posibilidad de introducir los machos a los 3-4 días de la inseminación (objetivo deseable) no tendría como consecuencia la superposición de partos si no hubiera ovejas que ovularan antes de los 14 días posteriores a la inseminación. Sin embargo si se produjeran ovulaciones dentro de los 10 días siguientes a la inseminación (ciclos cortos u ovejas que no han respondido a la sincronización) sin duda se puede producir una superposición de partos, y en consecuencia se perdería la fiabilidad en la determinación de paternidades en función de las fechas de inseminación y parto. En función de nuestros datos, un intervalo inseminación-monta de 10 días, discriminaría correctamente la asignación de paternidades.

Este trabajo ha sido financiado en parte por Junta de Castilla y León, ANCHE y Caja de Burgos.

INTRODUCCIÓN

Con el fin de contribuir al estudio de un intervalo mínimo entre la inseminación y la introducción de machos, que abarate costes de manejo de lotes sin que se produzcan confusiones en asignación de paternidades,

Ventajas de reducción de intervalo

Problemática de la superposición de partos

MATERIAL Y MÉTODOS

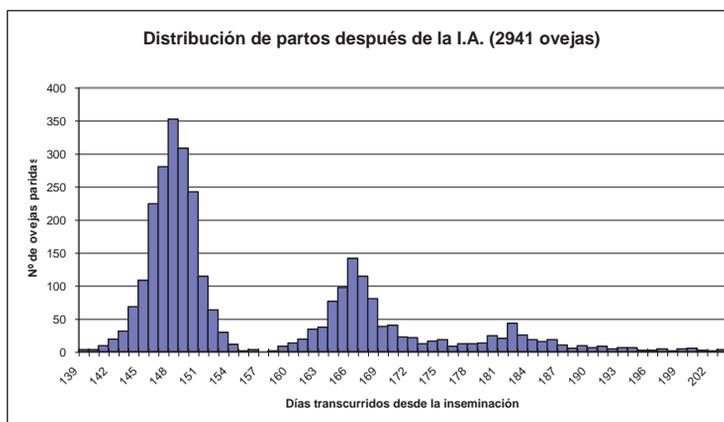
Para la realización del presente estudio se han analizado los datos procedentes de de inseminaciones artificiales por vía intrauterina realizadas dentro del programa de perfeccionamiento y aplicación de esta técnica dentro del esquema de selección de la raza Churra. Se han procesado los datos correspondientes a 2941

partos de corderas y ovejas entre 1 y 9 años de edad, distribuidas en rebaños de Castilla y León en el periodo comprendido entre octubre de 1993 a marzo de 1996. Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales de 30 mg de FGA mantenidas durante 12 días y las corderas con esponjas intravaginales de 40 mg de FGA mantenidas durante 14 días. La inseminación intrauterina se realizó entre las

Se considera día cero el día de la inseminación intrauterina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los partos producidos, 1868 corresponden a ovejas preñadas como consecuencia de la inseminación. Para estas ovejas, con fecha de inicio de gestación conocida, la moda queda establecida en el día 148 post-inseminación. En este día se producen el 18,8 % de los partos. En el intervalo 148 ± 4 días se producen el 94,2 % de los partos, mientras que en los 5 días anteriores a este intervalo se producen el 3,5 % y en los 5 días posteriores el 2,3 %.



Actualmente se está dejando un intervalo entre inseminación e introducción de machos de 14 días. La gráfica adjunta corresponde a lotes de ovejas con este tipo de protocolo de introducción de machos. Como puede observarse prácticamente no existen días vacíos entre los partos de inseminación y los partos de macho.

La pregunta a responder sería la siguiente:

¿Si se introdujeran los machos antes de los 14 días se produciría una superposición de partos entre los de inseminación y los de monta?. En reuniones anteriores se ha indicado por otros grupos de trabajo que dicha superposición no se produce (o es mínima su incidencia).

Si se introdujeran los machos a los 3-4 días de la inseminación (objetivo deseable) no se produciría esta superposición de partos si no hubiera ovejas que ovularan antes de los 14 días posteriores a la inseminación (o fuera un porcentaje muy pequeño del total). Sin embargo si se produjeran ovulaciones dentro de los 14 días siguientes a la inseminación (ciclos cortos u ovejas que no han respondido a la sincronización) sin duda se produciría superposición de partos, pues sólo existen cuatro días vacíos (sin partos) en el estudio realizado.

CORRELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS VAGINALES Y EL ESTADO OVÁRICO EN OVEJAS SINCRONIZADAS.

*Alvarez, M.; *Anel, L.; *Anel, E.; **Boixo, J.C.; *Manso, A.; *Dominguez J.C.; ***Olmedo, J.A. & *Chamorro, C.

*Unidad de Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria Universidad de León. Campus de Vegazana s/n. 24071 **León**. Tfno. 003487291320 Fax 03487291322 **CENSYRA. Junta de Castilla y León. ***Diputación de Valladolid.

Este trabajo ha sido financiado en parte por: ANCHE y Junta de Castilla y León.

Durante el celo, el aparato genital de la hembra sufre modificaciones respecto a la época de reposo sexual. La valoración de variaciones tales como, la producción de moco (PM) (Kunz et al., 1996), el estado hiperémico de la vagina (HV) y el enrojecimiento del orificio uterino externo (EOUE) puede ser importante en la predicción del estado ovárico, y en consecuencia, en la búsqueda del momento más adecuado para realizar la inseminación artificial por vía vaginal.

Por otro lado, el establecimiento de una relación entre el estado ovárico y el resto de características del aparato genital en el momento de la inseminación artificial nos permitiría seleccionar aquellas hembras que poseyeran unas determinadas condiciones que mejorasen la fertilidad y desechar aquellas en que se pudiera prever un bajo rendimiento de la técnica. Esto sería de gran valor cuando la inseminación se realizase vía vaginal en la que sólo se cuenta con los datos que aporta la inspección vaginal "in situ" (Alvarez et al, 1995). El objetivo de este trabajo es el estudio de aquellas características de la vagina y del cérvix, que pudieran afectar a los resultados de fertilidad en la inseminación cervical (Schakell et al., 1990).

Material y métodos

Para realizar este estudio se utilizaron 316 hembras adultas, de raza Churra, que fueron sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización del celo mediante esponjas intravaginales (FGA, acetato de fluorogestona) durante 12 días y 500 UI de eCG en el momento de la retirada del progestágeno.

Se realizó una inspección vaginal (vaginoscopia) y ovárica (por vía laparoscópica) del aparato genital. Para ello las ovejas se dividieron en dos grupos, en el primero la inspección se realizó a las 54 horas de la retirada del progestágeno y en el segundo a las 64 horas. Las características observadas en la vagina fueron: producción de moco (cantidad, consistencia y color), hiperemia vaginal (HV) y enrojecimiento del OUE (EOUE). En la laparoscopia exploratoria se determinó la existencia de ovarios activos (OA), folículos (F), folículos preovulatorios (FP) y puntos de ovulación (P).

Resultados y discusión

Según los resultados obtenidos se ha observado que a las 54 horas existen diferencias significativas en la cantidad ($p < 0,01$) y en el color de moco cervical ($p < 0,05$). Existe una mayor producción de moco en aquellas hembras en cuyos ovarios hay un folículo respecto aquellas que ya han ovulado (Tabla 1, Gráfico 1). Esto tiene una explicación fisiológica ya que el moco se produce en mayor cantidad antes de la ovulación para permitir el ascenso y la viabilidad de los espermatozoides en el aparato genital de la hembra (Seleive- Villarroel et al., 1983). Esto indica que el transporte de espermatozoides está bajo el control endocrino del folículo dominante, el

cual atrae un mayor número de espermatozoides hacia su propio oviducto (Kunz et al., 1996).

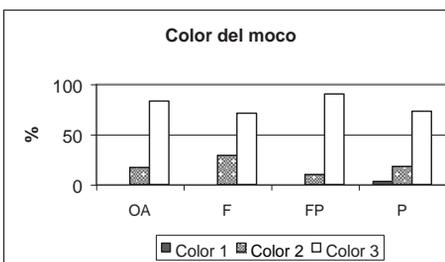
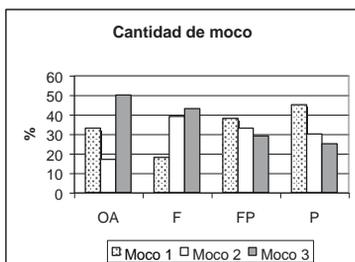
ESTRUCTURAS	Moco 1(%)	Moco 2(%)	Moco 3(%)
OA ^{AB}	33	17	50
F ^A	18	39	43
FP ^{AB}	38	33	29
P ^B	45	30	25

Tabla 1. Porcentajes de animales que presentan diferentes tipos de clasificación de cantidad de moco según la estructura ovárica (Moco 1= poco; Moco 2= intermedio; Moco 3= mucho). Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto al color del moco en ovejas con un folículo normal frente aquellas con folículo preovulatorio (Tabla 2, Gráfico 2). Cuando existe un folículo hay más porcentaje de moco de color ligeramente opaco que cuando existe un folículo preovulatorio, donde la mayoría del moco encontrado tiene un color transparente. Por lo tanto, según se aproxima el momento de la ovulación, el moco cervical se “aclara” o se hace más transparente.

estructuras	color 1(%)	color 2(%)	color 3(%)
OAab	0	17	83
Fa	0	29	71
FPb	0	10	90
Pab	3	18	78

Tabla 2. Porcentajes de animales que presentan los diferentes tipos de clasificación del color de moco según estructura ovárica (Color 1=Opaco; Color 2=Ligeramente opaco y Color 3=Transparente).



Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

GRAFICO 1

GRAFICO 2

A las 64 horas se observó más hiperemia vaginal ($p < 0,05$) cuando existe un folículo en los ovarios que después de la ovulación (Tabla 3, Gráfico 3). La hiperemia vaginal parece ser otra característica asociada al celo y concretamente a las fases iniciales y medias del mismo, en donde los niveles estrogénicos son más altos, por lo que después de producida la ovulación el aporte sanguíneo de la vagina disminuye ligeramente (Tokos et al., 1990; Kucharski et al., 1989).

estructuras	hiperemia 1(%)	hiperemia 2(%)	hiperemia 3(%)
oAab	50	0	50
Fa	14	75	11
FPab	33	53	13
Pb	39	44	17

Tabla 3. Porcentajes de animales que presentan los diferentes tipos de clasificación de hiperemia vaginal según la estructura ovárica (hiperemia 1=no; hiperemia 2=intermedia.; hiperemia 3=si). Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

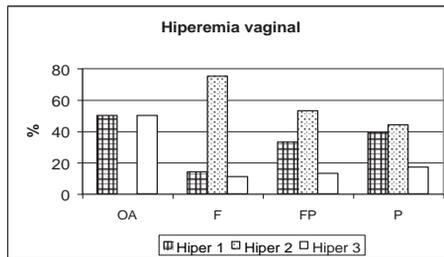


GRAFICO 3

En el análisis conjunto de los datos sólo se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el estado hiperémico de la vagina y en el mismo sentido que las observadas a las 64 horas. En cuanto al enrojecimiento del OUE (EOUE) y la consistencia del moco no se observaron diferencias significativas en los dos horarios analizados. Un dato importante a tener en cuenta es que a las 54 horas habían ovulado el 35.3% de ovejas mientras que a las 64 horas el 64.75% tenían puntos de ovulación.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que cuando se realiza la inseminación cervical y se observa gran cantidad de moco de color transparente o gran hiperemia vaginal, es probable que la oveja presente folículos en sus ovarios, por lo cual sería el momento ideal para aplicar el semen, dado que las condiciones de ascenso en el aparato genital serían buenas. En cambio, si la producción de moco ha disminuido puede suponerse que la hembra ya habrá ovulado y probablemente los espermatozoides aplicados en el fondo vaginal o sobre el OUE "llegarán" con retraso al lugar de fecundación porque las condiciones del moco no serán tan propicias.

Bibliografía

- Alvarez, M.; Anel, L.; Carbajo, M.; Chamorro, C.; Boixo, J.C.; Anel, E. y Domínguez, J.C. (1995). Influencia de las características del moco cervical en los resultados de fertilidad en inseminación artificial ovina (via vaginal). XX Jornadas Científicas de la SEOC, Madrid.. Libro Comunicaciones:135-138.
- Kunz, G.; Beil, D.; Deininger, H.; Wildt, L. and Leyendecker, G. (1996). The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingosintigraphy. Human Reprod. 11(3): 627-632.
- Seive-Villarreal and Kennedy, J.P. (1983). Fertility studies in young and mature Merino ewes. Theriogenology 20(5): 537-541.
- SCHAKELL, G.H.; KYLE, B. and LITTLEJOHN, R.P. (1990). Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production 50: 427-430.
- KUCHARSKI, J.; ZEZULA-SZPYRA, A.; DOBOSZYNSKA, T.; MILEWSKI, S.; TANSKI, Z. and MERCIK, L. (1989). The postpartum period in a select group of ewes of Polish Merino sheep. II. Clinical observations of the sexual organs. Polskie-Archiwum-Weterynaryjne: 29: 201-210.
- TOKOS, M.; TOKOSOVA, M. and ARENDARCIK, J. (1990). Biometrical changes in the genital organs of ewes after synchronization of oestrus and superovulation in the mating period. Veterinarni-Medicina. 35: 31-36.

CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DEL CUELLO UTERINO DE LA OVEJA CHURRA.

ÁLVAREZ, M.; ANEL, E.; ANEL, L.; CHAMORRO, C.; BOIXO, J.C.¹ y RODRIGUEZ, C.

Reproducción Animal, Universidad de León, 24071, León, España.

Tfno 987 291320 Fax 987 291322 e-mail: dslar@unileon.es.

¹CENSYRA, Junta de Castilla y León.

Resumen: La anatomía del cérvix ovino condiciona la eficacia de la inseminación artificial al constituir una barrera física para la penetración del catéter hasta el interior del útero. El objetivo del presente trabajo es el estudio morfológico-morfométrico de la estructura cervical en ovejas de raza Churra a partir de piezas de matadero.

Se emplearon cuellos uterinos, procedentes de ovejas churras adultas, que fueron sometidos a una cuidadosa disección de los tejidos circundantes antes de realizar las medidas siguientes: longitud, anchura externa, número de anillos, anillo más excéntrico, anchura o diámetro del punto más estrecho, distancia del anillo más excéntrico al inmediatamente posterior, distancia del OUE (orificio uterino externo) a cada uno de los anillos cervicales (DIA 1=distancia del OUE al primer anillo, DIA 2= al segundo anillo, DIA 3= al tercer anillo y DIA 4= al cuarto anillo en caso de que existiera), altura del anillo 1 y 2 (desde la base hasta la zona libre en la luz cervical).

Según los resultados obtenidos del estudio morfométrico se puede considerar el cuello uterino de la oveja una estructura semirrígida y cilíndrica que posee una longitud media de $6,19 \pm 0,89$ cm y una media de $4,35 \pm 0,92$ anillos o pliegues fibrosos que ocluyen la luz. De todos ellos el anillo más excéntrico (aquel que no está alineado con el resto) es el segundo a partir del orificio uterino externo.

Introducción: Los resultados de fertilidad que se obtienen tras la inseminación artificial ovina por vía cervical se ven afectados por múltiples factores, entre ellos adquiere una gran importancia la anatomía del cérvix al constituir una barrera física en la penetración del catéter de inseminación.

Los anillos cervicales son más numerosos e irregulares en la oveja que en otras especies (vaca y cabra). En el cérvix caprino los pliegues están alineados, pero en el cérvix de la oveja, el segundo pliegue se encuentra casi siempre desalineado con el primero (Bunch T., 1981; Halbert et al., 1990), por lo que un instrumento recto pasaría a través de la abertura exterior del cérvix hasta el segundo pliegue en que encontraría una cavidad ciega que impide su progresión hasta el útero.

Los pliegues o anillos han sido definidos de diferentes formas por diversos autores; algunos los consideran como conos truncados, cuya base se sitúa cranealmente y el vértice caudalmente (Moré, 1981), otros los definen como estructuras en forma de "embudos" o "chimeneas" (Halbert, 1990). Concretamente Halbert et al (1990) realizan una descripción detallada del cérvix de diferentes razas ovinas y encuentran que los anillos no están alineados. Además, en la mayoría de las ovejas, el punto más estrecho del canal está situado en el segundo o tercer anillo.

El presente trabajo pretende estudiar las características morfológicas del cuello uterino en ovejas de raza Churra a partir de piezas de matadero.

Material y métodos: Para realizar el presente estudio se emplearon cuellos uterinos procedentes de ovejas adultas de raza Churra obtenidos del Matadero Municipal de León. Los cuellos uterinos se disecaron cuidadosamente de los tejidos circundantes e inmediatamente se utilizaron para medir los siguientes parámetros:

- Longitud
- Anchura externa
- Número de anillos
- Anillo más excéntrico: anillo o pliegue cervical que no está alineado con el resto (ANIEX).
- Anchura o diámetro del punto más estrecho del canal cervical (ANPE).
- Distancia del anillo más excéntrico al inmediatamente posterior a él (DIAMES).

-Distancia del OUE a cada uno de los anillos cervicales (DIA 1= distancia del OUE al primer anillo; DIA 2=al segundo anillo, DIA 3=distancia al tercer anillo y DIA 4 al cuarto anillo en caso de que existiera).

-Altura del primer anillo (desde la base hasta la zona libre en la luz cervical).

-Altura del segundo anillo (igual al anterior).

Se desecharon todos los tractos reproductivos que mostraban alguna patología o aquellos en que el parto había sido reciente y la involución uterina no era completa.

Resultados y discusión: Según estos datos se puede considerar que el cuello uterino de la oveja es una formación de morfología cilíndrica que mide 6,19 cm de largo y 1,11 cm de ancho. El número de anillos oscila entre 4 y 5 y el anillo más excéntrico con respecto a los demás es el segundo. El diámetro mínimo medio de la luz cervical es de 2mm y se corresponde con el anillo más cerrado, es decir, con el segundo en el presente estudio (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Medidas de diferentes parámetros del cuello uterino de la oveja.

Medidas	Media \pm ds	n
Longitud (cm)	6,19 \pm 0,89	639
Anchura externa (cm)	1,11 \pm 0,31	563
Nº de anillos (n)	4,35 \pm 0,92	370
ANPE (cm)	0,20 \pm 0,07	171
DIAMES (cm)	0,95 \pm 0,36	199
ANIEX (n)	2,01 \pm 0,48	163

Para Halbert et al. (1990) la longitud media del canal cervical es de 6,7 \pm 1,1cm y contiene 4,9 \pm 1,0 anillos. El anillo excéntrico, para este grupo de investigadores es el segundo o el tercero y la anchura o diámetro medio de estos anillos es de 2,7 \pm 1,1mm. La distancia desde el anillo excéntrico al inmediatamente posterior es de 9,8 \pm 3,1mm. Todos los parámetros observados por nuestro grupo investigador están en relación con los resultados expresados por Halbert et al. (1990) aunque estos autores utilizan razas ovinas distintas y es evidente que existen diferencias en la longitud y número de anillos según la raza objeto de estudio. Selaive-Villarreal et al. (1983) observan que la longitud de este órgano varía en función de la edad y encuentran un valor medio de 5,44cm en las ovejas adultas frente a 4,42cm en las hembras jóvenes. Para Veksler-Hess et al. (1992) la longitud media del cérvix oscila entre 7-9cm y el número medio de 3-5 anillos en el 91,6% de los animales que observaron. Eppeleston et al. (1994) observan una longitud media del cervix para ovejas adultas de 4,87 \pm 0,10 cm y 3,97 \pm 0,13 anillos, una medida ligeramente inferior a la señalada en nuestro trabajo.

Por otro lado, el grado de correlación existente entre la longitud del cérvix y el número de anillos es muy bajo ($r=0,09\pm 0,06$), por lo que no es posible según nuestros resultados, predecir el número de anillos a partir de la longitud. El coeficiente de correlación entre la anchura externa del cérvix con la anchura del punto más estrecho (ANPE) es asimismo muy bajo ($r=0,02\pm 0,81$) y no significativo, por lo tanto aunque un cuello tenga una anchura externa grande ello no indica que el diámetro de su luz también lo sea.

Bibliografía:

- Bunch, T. y Ellsworth, H. (1981) Gross anatomy of the ovine cervix. *Int. Goat and Sheep Res.* 1(4): 282-285.
- Eppeleston, J., Salomon, S., Moore, N.W., y Evans, G. (1994) The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* 36: 211-225.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., y Buckrell, B.C. (1990) The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
- Moré, J. (1984) Anatomy and Histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta anat.* 120: 156-159.
- Selaive-Villarreal, A.B. y Kennedy, J.P. (1983) Fertility studies in young and mature merino ewes. *Theriogenology* 20: 537-541.
- Veksler-Hess, J.D. y Cissale, H. (1992) Selection of ewes for artificial insemination on the basis of the conformation of the cervix. *Veterinaria Argentina* 9: 680-685.

RELATION BETWEEN OF THE DEPTH OF CERVICAL INSEMINATION AND PROLIFICACY IN SHEEP

Alvarez, M., Anel, L., Anel, E., Boixo, J.C.¹, Paz, P., Chamorro, C.,
Peña, F.J., Domínguez, J. C. and Celorrio, I.

Animal Reproduction. León University. 24071, León, Spain. e-mail:dslar@unileon.es.
¹CENSYRA. Junta de Castilla y León.

Introduction. Several works have found that the pregnancy rate increases as the depth of cervical penetration increases (Eppleston et al., 1994, *Anim. Reprod. Sci.* 36: 211-225; Smith et al., 1995, *Proc. of the New Zealand Soc. of Anim. Product.* 55: 248-250; Alvarez et al., 1996*, *Proc. XXI Scientific Cong. of SEOC (Logroño, Spain)*). The anatomical structure of the cervical canal of the ewe restricts the passage of insemination instruments, which have been developed for cow and goat. The development of a practical commercial artificial insemination (AI) programme using frozen semen requires a technique for depositing semen into the uterus through the cervix (Halbert et al., 1990, *Theriog.* 33: 977-992). The aim of this study was to determine the effect of AI depth on litter size (lambs born per ewe).

Materials and methods. Mature Churra breed ewes (n=2077) were synchronised (fluorogestone acetate intravaginal pessaries-14 days+eCG 500iu) and were inseminated with chilled (15°C) semen 55±1h after progestagen removal (400x10⁶ spz/dose in tris citrate extender). A technician (the same for all inseminations) passed a straight catheter through the cervix to the greatest point of penetration. A numerical value of 0 to 4 was assigned to the depth of insemination (0 = the semen is simply deposited into the anterior vagina. 1 = slight penetration of the cervix, a great amount semen flowing back into vagina. 2 = deeper penetration and partial flow back of semen. 3 = penetration about middle cervix and low flow back of semen. 4 = penetration into the uterus). The small number of animals in AI type 0 (n=4) and 4 (n=1) is not relevant for the present study. The depth of AI was recorded and the lambing results (pregnant ewes= 670) were analysed by means of the Chi-Square test.

Table 1: Results depth of cervical insemination and its relation with prolificacy.

AI type (depth)	Single lambing %	Double lambing n	Double lambing %	Double lambing n	Prolificacy (lamb/ewe)	Fertility* %
1	59,16	113	40,84 ^a	78	1,40	28,21 ^a
2	50,99	154	49,01 ^{ab}	148	1,49	31,02 ^{ab}
3	43,60	75	56,40 ^b	97	1,56	43,18 ^c
Total mean	51,64	346	48,36	324	1,48	32,39

Within a column, values with different superscripts are significantly different (P< 0.01).

Results and discussion: These data show that the litter size increases significantly (P≤0,01) when the depth of cervical penetration during insemination increases. To our knowledge, there are no previous reports on the effect of the depth of insemination and double lambing in sheep. However, in goats the kidding percentage is higher after uterine (via cervix) than cervical deposition (Ritar et al., 1989, *Small Rumin. Res.* 2: 323-331). These results may be related to fertility increases and the higher number of spermatozoa at the site of fertilization.

This study was supported in part by: **ANCHE** and **Junta de Castilla y León**.

MECHANICAL ASPECTS OF CERVICAL PENETRATION IN SHEEP DEPENDING ON PIPPETE TYPE

M. Kaabi¹, M. Álvarez¹, E. Anel¹, J.C. Boix², C.A. Chamorro³, J.A. Olmedo⁴, S. Martínez⁵ & L. Anel¹

¹Animal Reproduction. Veterinary Faculty. University of León. 24071-León (Spain). Phone 34 987 291417

²CENSYRA (León). ³Cellular Biology and Anatomy (University of León). ⁴Diputación de Valladolid. ⁵Diputación de León

INTRODUCTION

According to several reports (6, 7), cervical penetration depth in ovine artificial insemination (OAI) is the major factor limiting the fertility. Cervical penetration is influenced by many factors: ewe breed (4), individual ewe (7), operator's skill, technique, inseminating instruments, etc. In the present work, three insemination pipettes were tested to study physical aspects of cervical penetration (depth of penetration and the extender that flows back).

MATERIALS AND METHODS

Three different pipettes were assayed: 1°) Standard insemination pipette (IMV[®]); 2°) Straight pipette with bent tip (Minitüb[®]); 3°) Experimental pipette CAT06 with a fine (16G) stainless steel needle (4 cm length). The end of the needle was modified in the last 6 mm with a 15 degree angle (Leon University design). 33 Churra breed ewes and 33 Assaf breed ewes were synchronized (40 mg FGA and 500 UI eCG) and 55±1 hours after sponge removal the attempt of cervical penetration was performed (without semen: 0.25 ml seminal extender Tes-Tris-fructose-egg yolk). The penetration depth (0-4 cm) and extender flow back (none, partial or total) were noted. The three pipettes were tried in all ewes in three consecutive sessions (latin square 3x3). Within each session there was a 45 day gap. Data were analysed for both breed and pipette types factors using ANOVA (proc GLM for penetration and proc CATMOD for flow back; SAS[™]).

RESULTS AND DISCUSSION

There are no significant differences between the two studied breeds in both cervical penetration and flow back. As it is shown in Tables 1 and 2, the bent pipette (CAT06) allows higher penetration (with less flow back) than the other commercial pipettes assayed (p<0.05).

Table 1: Cervical penetration (cm) depending on breed and pipette type (Mean±SEM).

Pipette	Assaf	Churra
CAT06	3.4±0.2 ^a	3.5±0.2 ^a
IMV [®]	1.2±0.2 ^b	1.4±0.2 ^b
Minitüb [®]	1.1±0.1 ^b	1.5±0.2 ^b

Within same column, different superscripts differ significantly (Duncan test p<0.05)

Table 2. Frequency (%) of three flow back type depending on pipette type (Mean±SEM).

Pipette	None	Partial	Total	n
CAT06	73.0 ^b	19.1 ^a	7.9 ^a	64
IMV [®]	23.4 ^a	35.9 ^b	40.6 ^b	63
Minitüb [®]	23.4 ^a	31.7 ^{ab}	45.3 ^b	64

Within same column, different superscripts differ significantly (χ^2 ; p<0.05)

These results agree with other authors' results (4, 8); they improve penetration with pipettes similar to CAT06. The deep intracervical insemination increases fertility (3) though some authors argue about this improvement (1, 5) because of possible damages within the cervical canal (2).

REFERENCES-Cappai, P., Sanna, S.R., Branca, A., Fraghi, A. & Bomboi, G. (1998). Anim. Sci. 66:369-373. Campbell, J.W., Harvey, T.G., McDonald, M.F. & Sparksman, R.I. (1996). Theriog. 45:1535-1544. Eppleston, J., Salomon, S., Moore, N.W. & Evans, G. (1994). Anim. Reprod. Sci. 36: 211-225. Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Sharpe, P. & Buckrell, B.C. (1990). Theriog. 33, 6: 1231-1243. Sayre, B.L. & Lewis, G.S. (1996). Theriog. 45:1523-1533. Souza, M., Nadal, S. & Goncalves, P. (1994). Ciencia Rural 24, 3: 597-602. Windsor, D.P. (1995). Theriog. 43:1009-1018. Windsor, D.P., Széll, A.Z., Buchbeck, C., Edward, A.Y., Milton, J.T.B. Buckrell, B.C. (1994). Theriog. 42: 147-157. This work was supported by: FEDER (1FD97-0367), Diputación Valladolid, Junta de Castilla y León and Diputación León.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAUTERINA VÍA LAPAROSCÓPICA EN OVEJAS DE RAZA CASTELLANA: RESULTADOS PRELIMINARES.

ÁLVAREZ GARCÍA, M.; ANEL RODRÍGUEZ, E.; ¹GONZÁLEZ, C.; KAABI, M.; ²BOIXO PÉREZ-HOLANDA, J.C.; CHAMORRO ÁLVAREZ, C.A. Y ANEL RODRÍGUEZ, L.

Reproducción Animal, Campus de Vegazana s/n. Universidad de León. 24071-León.

¹ANCA ²CENSYRA León (Junta de Castilla y León)

RESUMEN

La raza Castellana constituye un núcleo ovino autóctono, localizado fundamentalmente en las provincias de Zamora, Salamanca y Valladolid, que tiene un censo reducido y una especialización productiva poco definida, lo que dificulta la implantación de un programa de mejora. Además los ganaderos de raza Castellana constituyen una población envejecida y económicamente desfavorecida respecto a otros ganaderos de razas foráneas más productivas. En este contexto, la principal característica de raza Castellana, la rusticidad, pierde importancia en una ganadería que tiende hacia los sistemas de producción intensivos. A pesar de todos estos problemas, los esfuerzos de su asociación de criadores (ANCA) han conseguido que un grupo de ganaderos inicien un programa de mejora de la producción lechera. Para la difusión del material genético se ha utilizado la inseminación artificial intrauterina por vía laparoscópica con semen descongelado en 7 ganaderías. En este trabajo, se ha evaluado por primera vez dicha técnica en esta raza obteniéndose una fertilidad media del 60,97% (n=638). Analizando algunos factores de variación de la fertilidad se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en distintas épocas del año, (mejor en otoño que en primavera), en las diferentes ganaderías y en los distintos años (1998: 70,00%, 1999: 43,79% y 2000: 68,71%) en que se realizaron las inseminaciones.

Palabras clave : inseminación intrauterina, Castellana, fertilidad

INTRODUCCIÓN

La raza Castellana es una población ovina que tiene un censo reducido, aproximadamente 300.000 cabezas de ovejas en pureza, distribuidas en las provincias de Zamora, Salamanca y Valladolid. La rusticidad de esta raza ha hecho que se adapte perfectamente a los sistemas de explotación más tradicionales basados fundamentalmente en el pastoreo (Lavín *et al.*, 1996; Martínez Sánchez *et al.*, 2000). La decadencia de los sistemas de producción extensivos (falta de mano de obra, baja producción, etc.), más el envejecimiento de la población de ganaderos de raza Castellana, sin expectativas de relevo generacional, han hecho que los programas de mejora genética no hayan fraguado de igual manera que en otras razas autóctonas. No obstante, en la actualidad está en marcha un programa de mejora de la producción lechera en 13 ganaderías que cuenta con 10.000 animales en control lechero (González, C., comunicación personal). La inseminación artificial, herramienta básica para la difusión de material genético, se utiliza en varias razas autóctonas como la Churra, Manchega, Laxta y Rasa Aragonesa (Anel *et al.*, 1992; Montoro *et al.*, 1994; Ugarte *et al.*, 1995; Fantova *et al.*, 2000) con resultados de fertilidad muy variables. El análisis de la fertilidad presenta dificultades debido a que intervienen muchos factores, cuya identificación y cuantificación es compleja (Shackell *et al.*, 1990; Evans, 1991; Aguer *et al.*, 1992). En cuanto al factor raza, la fertilidad obtenida tras la inseminación intrauterina vía laparoscópica varía entre el 45% para la raza Churra (Abroug, 2000), el 65% para la raza Merina (Evans, 1991) y el 55% para la raza Sarda (Sanna *et al.*, 1995). En la raza Castellana no existen estudios sobre fertilidad en inseminación artificial por lo que el objetivo de este trabajo es realizar una primera valoración de la técnica laparoscópica en esta agrupación racial así como el estudio de algunos factores que influyen en la fertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han inseminado 638 ovejas durante los años 1998, 1999 y 2000 pertenecientes a 7 explotaciones diferentes, en dos épocas del año (primavera y otoño). Las hembras, con edad inferior a 5 años y el periodo parto-IA mayor de 3 meses, se agruparon en lotes de tamaño variable (40 a 85 animales) y fueron sincronizadas mediante esponjas intravaginales (FGA-14 días) y 500 UI de eCG a la retirada de las mismas. A las 64 horas de la retirada del progestágeno intravaginal se lleva a cabo la inseminación intrauterina por vía laparoscópica (Killeen y Caffery, 1982, Anel *et al.*, 1992). La recogida seminal se realiza mediante vagina artificial, y para el procesado del eyaculado se utiliza un diluyente a base de Tes-Tris-fructosa-yema de huevo-glicerol (método UL, Anel *et al.*, 1993). Las pajuelas de 0,25 ml y de 25×10^6 espermatozoides totales se descongelan (65°C y 6 segundos) y se aplican inmediatamente tras la descongelación.

La eficacia de la inseminación se evalúa mediante diagnóstico ecográfico a los 35 días de realizada la inseminación. El estudio estadístico se realiza mediante un análisis de varianza para los factores explotación, año y estación utilizando el procedimiento CATMOD del programa SASTM. La comparación de los porcentajes se realiza mediante la prueba χ^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las hembras preparadas para la inseminación intrauterina vía laparoscópica, en el 4,2% no se insemina debido a varias causas solo detectadas mediante la técnica laparoscópica, como se observa en la Tabla 1. El uso de la técnica laparoscópica permite hacer diagnóstico diferencial entre distintas patologías y detectar puntos críticos que perjudican el éxito de la misma.

Tabla 1. Causas de "no inseminación" intrauterina en la raza Castellana.

	n	%
Ovejas preñadas antes de IA	17	62,9
Patologías uteroováricas (CL persistente, líquido en útero)	6	22,2
Adherencias intrabdominales	4	14,81
Total ovejas no inseminadas	27	100

Tabla 2. Fertilidad (diagnóstico ecográfico) según el año de inseminación.

Año	% Fertilidad	n
1998	70,00 ^a	40
1999	43,79 ^b	169
2000	68,71 ^a	326
Total	60,97	535

Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Tabla 3. Fertilidad según la época del año (diagnóstico ecográfico).

Época	% Fertilidad	n
Primavera	50,79 ^b	252
Otoño	69,96 ^a	283
Total	60,97	535

Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$).

En cuanto al factor explotación se observan diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las 7 ganaderías en las que se han realizado las inseminaciones, oscilando la fertilidad entre el 35% y el 77%, amplias variaciones que también ocurren en la raza Churra (del 19 al 59%, Abroug, 2000). Algunos autores consideran que el factor explotación (manejo, alimentación, condición sanitaria, etc.) es uno de los que más influye en los resultados de la inseminación (Pons *et al.*, 1990, Arrese *et al.*, 1991) y la adaptación de cada ganadería a las actividades que implica la inseminación supone una mejora en los resultados de la misma. Las diferencias interanuales de fertilidad son conocidas en otras razas como la Manchega (Montoro *et al.*, 1994), la Churra (Abroug, 2000) y dependen de muchos factores, en este estudio se observa una disminución importante de la fertilidad en el año 1999 (Tabla 2), lo cual puede deberse a condiciones climatológicas que influyen en la disponibilidad de pastos (raza de explotación extensiva o semiextensiva). Por otro lado, la época más favorable para realizar las inseminaciones es el otoño aunque los resultados en primavera no parecen verse muy afectados debido quizás a que las inseminaciones se realizaron durante el mes de junio (Tabla 3). En la raza Churra la fertilidad es mejor en los meses de otoño (46,8%) que en primavera (42,2%; Abroug, 2000), aunque con la técnica laparoscópica las diferencias estacionales son menos acusadas que con la inseminación vaginal. El estudio de la fertilidad según la edad de las hembras muestra que la fertilidad es mayor para ovejas (64,86%) que para las corderas

(36,40%), pero estos resultados no son muy relevantes porque el número de corderas inseminadas en este trabajo es muy reducido (n=77) y la mayoría de los autores obtienen mejores resultados con hembras nulíparas (Anel *et al.*, 1992; Gabiña y Folch, 1987; Montoro *et al.*, 1994).

Cuando se compara la fertilidad (diagnóstico ecográfico) de la raza Castellana (60,97%) con otras razas que utilizan la técnica laparoscópica se observan resultados superiores a los de la raza Churra (45%, Abroug *et al.*, 2000), y similares a las de otras razas como la Merino Australiano (56,8%, McPhie y Maxwell, 2000) o la Sarda (55% ; Sanna *et al.*, 1995). Cuando se analizan los resultados de partos en un pequeño número de ovejas (Tabla 4), se observa que la fertilidad disminuye hasta un 45%, similar a la señalada para la raza Churra. En la Tabla 4 se observa que existe una pérdida de gestaciones del 8,58% desde el diagnóstico de gestación mediante ecografía hasta el parto, lo cual puede explicarse por un deficiente manejo del rebaño, abortos, etc, hecho que es más acusado en algunas explotaciones.

Tabla 4. Resultados de fertilidad en ecografía y en partos en 5 explotaciones.

Explotación	Ecografía (%)	Partos (%)	n
A	62,96	46,29	54
B	51,92	44,23	104
C	60,00	56,00	50
D	59,52	54,76	42
E	35,84	26,41	53
Total	53,46	44,88	303

CONCLUSIONES

La fertilidad en la raza Castellana con inseminación intrauterina laparoscópica es similar a la de otras razas (Churra, Merino, Sarda, etc) que utilizan la misma técnica. La fertilidad varía significativamente según la explotación, el año y la época de inseminación. Las pérdidas de gestación post-ecografía indican que se necesita una mejora en el manejo de los animales inseminados para incrementar el rendimiento real de la técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- ABROUG, B. 2000. Les facteurs de variation des resultats de l'insemination artificielle chez la race ovine Churra. Tesis de «Master of Science» I.A.M. Zaragoza. España.
- ABROUG, B.; ANEL, E.; KAABI, M.; BOIXO, J.C.; ÁLVAREZ, M.; DE LA FUENTE, L.F.; CHAMORRO, C. Y ANEL, L. 2000. Post-insemination fertility in Churra ewe: factors of variation. *14th International Congress on Animal Reproduction*, 2, 89. Estocolmo.
- AGUER, D. ; PAREZ, V. ; BELLOC, J.P. Y BRIOIS, M. 1992. Routine use of oestrus synchronization and artificial inemination with diluted semen a survey on 2.782735 ewe lambs and adult ewes. *12th International Animal Reproduction*. Vol 2 :1520-1522. Th Hague. Netherland.
- ANEL, L.; BOIXO, J.C.; ANEL, E.; CARBAJO, M.; DOMÍNGUEZ, J.C.; OLMEDO, J.A.; ÁLVAREZ, M.; CHAMORRO, C. Y PAZ, P. 1992. Inseminación intrauterina (laparoscopia) en ovejas. Resultados preliminares de su aplicación en condiciones de campo. *Proc 6^{as} Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e IA, Salamanca* 354-359.
- ANEL, E.; MANSO, A.; ANEL, L.; BOIXO, J.C.; ÁLVAREZ, M.; DOMÍNGUEZ, J.C. Y CARBAJO, M. 1993. Estudio comparativo de tres metodologías para la crioconservación del semen de morueco. *V Jornadas sobre producción animal (AIDA)*, Zaragoza, ITEA Vol extra nº 12 Tomo II: 495-497.
- ARRESE, F.; BELTRAN HEREDIA, D.; LOPEZ DE MUNAIN, J.M. Y ARRANZ, J. 1991. Influencia de algunos factores de manejo sobre los resultados de inseminación articial en la raza Latxa y Carranzana. *I.T.E.A. Vol. Extra*. (11):52-54.
- EVANS, G.; 1991. Application of reproductive technology to the australian livestock industries. *Reproduction and Fertility Development*. 3(6) :627-650.
- GABIÑA, D. Y FOLCH, J. 1987. La inseminación artificial ovina. Resultados de su aplicación en un programa de selección en la raza Rasa Aragonesa. *I.T.E.A.* (68) :15-25.
- KILLEN I.D. Y CAFFERY G.J. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal* 59, 95.
- LAVÍN,P.; MANTECÓN, A.R. Y GIRÁLDEZ, F.J. 1996. Sistemas de pastoreo y utilización del territorio. *Ovis*, 43, 11-25.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, F. RODRÍGUEZ RUIZ, L., TORRES SÁNCHEZ, D.M., SOPENA LOSCERTALES, J., REAL PÉREZ, M.A. Y FERNÁNDEZ CALLEJO, M. 2000. Gestión técnico económica en explotaciones de ovino de leche en Castilla y León. Campaña 1999. Aspectos técnicos. *XXV Jornadas Científicas de la SEOC*, 197 Teruel.
- MCPHIE, C.A. ; EVANS, G. Y MAXWELL, W.M.C. 2000. Effect of supplementation of fresh an frozen-thawed semen with seminal plasma on fertility of ewes after cervical and intrauterine insemination. *14th International Congress on Animal Reproduction*, 2, 78. Estocolmo.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PENETRACIÓN CERVICAL DE CUATRO CATÉTERES DE INSEMINACIÓN EN LA ESPECIE OVINA

M. Kaabi, M. Álvarez, E. Anel, ¹J.C. Boixo, ²C.A. Chamorro, ³J.A. Olmedo, ⁴S. Martínez, ²P de Paz & L. Anel.

Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071-León (España). e-mail: dsamk@unileon.es

¹CENSYRA (León). ²Biología Celular y Anatomía (Universidad de León). ³Diputación de Valladolid. ⁴Diputación de León

RESUMEN- El grado de penetración cervical en la inseminación artificial ovina por vía vaginal es un factor fundamental ya que existe una correlación positiva entre la fertilidad y la profundidad de la inseminación. Con el objetivo de mejorar la mecánica de la inseminación mediante el aumento de la penetración cervical, realizamos un estudio comparativo de penetrabilidad entre 4 catéteres de inseminación en dos razas ovinas (Churra y Assaf.) Los catéteres utilizados fueron uno comercial recto como control (IMV) y tres diseñados en la Universidad de León (UL): 2 con agujas metálicas de 4 cm de longitud cuyas puntas están curvadas en los 6 (CAT06) y 8 primeros mm (CAT08) con una excentricidad de 15° y uno con aguja de 6 cm modificada en forma Zigzag (ZIGZAG). El estudio se realizó sobre 4 lotes de ovejas sincronizadas (FGA, 14 días + 500 UI eCG) de cada raza en 4 sesiones espaciadas 45 días, aplicando un diseño factorial de tipo cuadro latino (4 catéteres x 4 lotes x 4 sesiones). En iguales condiciones que en la inseminación artificial, los catéteres se probaron para la penetración cervical y el grado de reflujo de una dosis de diluyente (sin espermatozoides). El análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) de penetración entre el catéter comercial (1,49 cm) y los que han sido diseñados en la UL (3,52; 3,45 y 3,15 cm respectivamente para los catéteres CAT06; CAT08 y ZIGZAG, no detectándose diferencias entre ellos). Respecto al reflujo, con los catéteres que más penetraron se produjo menor reflujo y viceversa ($p < 0,05$). Entre las dos razas estudiadas no existen diferencias significativas ni para la penetración cervical ni para el reflujo.

INTRODUCCIÓN -Los bajos resultados de fertilidad de la inseminación artificial en la especie ovina se deben a muchos factores que frenan la realización de una adecuada inseminación. Entre ellos, se destacan aquellos relativos a la especie tal como la estacionalidad, el tamaño del animal y sobre todo la estructura morfológica del cuello uterino. Este último presenta una estructura anatómica muy compleja con un pequeño diámetro de luz cervical marcado por la presencia de muchos anillos cervicales (entre 4 y 6) que dificultan el paso de los catéteres rectos de inseminación hacia el útero y en la mayoría de los casos el semen se deposita en el fondo de la vagina o apenas por encima del orificio uterino externo (Fukui y Roberts, 1978; Halbert et al., 1990; Eppleston et al., 1994; Álvarez, 2000). Los anillos cervicales son más numerosos y más desalineados en la oveja que en la vaca y en la cabra, así en la oveja el segundo pliegue se encuentra siempre desalineado respecto a las posiciones del primero y del tercero (Bunch y Ellsworth, 1981; Trejo y Corona, 1987; Álvarez, 2000), lo que complica el avance del catéter de inseminación y la realización de una inseminaciones profundas. Respecto a la fertilidad de la inseminación artificial ovina, muchos trabajos demuestran una correlación positiva entre la profundidad de la inseminación y la tasa de fertilidad (Souza et al., 1994; Windsor, 1995; Nikolov et al., 1997; Álvarez, 2000), por lo tanto, la mejora de la técnica de inseminación artificial por vía vaginal debe ir encaminada en gran parte en la modificación de la mecánica de la IA adaptando sobre todo nuevos catéteres a la estructura interna del cérvix ovino para permitir mayor grado de penetración cervical con mayor facilidad. En el presente trabajo realizamos un estudio comparativo de la penetración cervical y del grado de reflujo de la dosis de inseminación de 4 catéteres en dos razas ovinas, Churra y Assaf.

MATERIAL Y METODOS-Se utilizaron 28 ovejas de raza Churra y 28 de raza Assaf que han sido repartidas en 4 lotes iguales y sincronizadas de la misma manera que en condiciones de inseminación (40mg FGA y 500 UI eCG). A las 55±1 horas tras la retirada del progestágeno, se realizaron las pruebas de penetración cervical (sin semen: 0,25 ml de diluyente seminal Tes-Tris-fructosa) anotándose la penetración (0-4 cm) y el grado de reflujo (nulo, parcial o total). Se probaron 4 catéteres de inseminación, uno de ellos es comercial y tres han sido diseñados en la Universidad de León (UL):

- Catéter recto estándar (IMV[®])*
- Catéter con aguja de 4 cm con un ángulo de 15° en los 6 primeros mm (CAT06)*
- Catéter con aguja de 4 cm con un ángulo de 15° en los 8 primeros mm (CAT08)*
- Catéter con aguja de 6 cm modificada en forma de zigzag (ZIGZAG)*

El trabajo (preparación de ovejas y valoraciones) se repitió en 4 sesiones espaciadas de 45 días según un diseño factorial de tipo cuadro latino (4 catéteres x 4 lotes x 4 sesiones) de tal manera que en cada sesión se prueben los 4 catéteres (un catéter por lote) y que al final de las sesiones cada lote tenga datos de los 4 catéteres.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (PROC GLM para los datos de penetración: cm; y PROC CATMOD para los datos de reflujo: Nulo, Parcial y Total) utilizando como factores de variación la raza, la sesión, el lote y el tipo de catéter. Se utilizó el test Duncan y la prueba χ^2 respectivamente para la comparación de las medias de penetración y de los porcentajes de cada tipo de reflujo

RESULTADOS Y DISCUSION-Los resultados de penetración cervical y de grado de reflujo no muestran diferencias significativas entre las dos razas ovinas estudiadas en este trabajo. Como se observa en la tabla 1 y 2, los catéteres diseñados en la Universidad de León proporcionan penetraciones cervicales medias significativamente mayores ($p < 0,05$) que la que se obtiene con el catéter recto estándar (IMV®). Estas diferencias de penetración se deben a las diferencias estructurales entre los catéteres, en efecto, los catéteres UL, a base de agujas modificadas, permiten localizar la luz cervical en los anillos excéntricos gracias al ángulo que existe entre los primeros mm de la aguja y el resto del catéter. El catéter ZIGZAG no aporta una mejoría de la penetración cervical comparándolo con el CAT06 y el CAT08, lo que implica que para penetrar el cérvix ovino, es igual utilizar un catéter con una sola curvatura o con varias, ya que para penetrar el cuello uterino bastaría atravesar los primeros cm del cérvix donde se encuentra la desalineación de la luz cervical provocada por la presencia del anillo el más excéntrico (generalmente el segundo: Trejo y Corona, 1987; Álvarez 2000). Aunque no hay diferencias significativas entre los catéteres UL, señalamos que es más cómodo en la práctica fabricar y usar un catéter con una sola curvatura (CAT06 o CAT08) que otro con varias curvaturas como el caso del catéter ZIGZAG,

Tabla 1: Penetración cervical en función del tipo de catéter (cm).

Catéter		Media \pm es	n
UL	CAT06	3,52 \pm 0,20 ^a	54
	CAT08	3,45 \pm 0,19 ^a	55
	ZIGZAG	3,15 \pm 0,19 ^a	55
Comercial	IMV®	1,49 \pm 0,19 ^b	53

Superíndices distintos indican diferencias significativas (Test Duncan, $p < 0,05$).

Tabla 2. Variación de cada tipo de reflujo según el catéter.

Catéter		Nulo	Parcial	Total	n
UL	CAT06	75,93 ^a	12,96 ^a	11,11 ^a	54
	CAT08	74,55 ^a	16,36 ^a	9,09 ^a	55
	ZIGZAG	65,45 ^a	18,18 ^a	16,36 ^a	55
Comercial	IMV®	24,53 ^b	37,74 ^b	37,74 ^b	53

Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas (χ^2 ; $p < 0,05$).

Estos resultados corroboran con los avanzados por otros autores (Halbert et al., 1990; Windsor et al., 1994; Álvarez 2000) que lograron mejores penetraciones utilizando unos catéteres cuyas características son parecidas a las de los catéteres curvos de nuestro experimento (CAT06 y CAT08). Sin embargo, según la literatura, los resultados de fertilidad, son muy contradictorios cuando se logran mayores penetraciones. Así, unos autores encuentran mejor fertilidad cuando la penetración cervical es profunda (Eppleston et al., 1994; Smith et al. 1995) y otros no (Cappai et al., 1998; Sayre y Lewis, 1996) Estas contradicciones pueden ser debidas a posibles traumatismos en el canal cervical (Campbell et al., 1996) que pueden ser más o menos importantes según el tipo de catéter y la mecánica de la IA en cada experimento. Por lo tanto, sería interesante determinar la fertilidad de estos nuevos catéteres y de los distintos grados de penetración relacionándola con los posibles daños que pueden ocurrir en el canal cervical. El diseño de nuevos catéteres para la inseminación transcervical, debería basarse en el principio de excentricidad (distancia y ángulo) del primer tramo, como detalle fundamental que permite realizar inseminaciones profundas (preferiblemente intrauterinas).

- REFERENCIAS**—Álvarez M. (2000): Estudio del cuello uterino de la oveja churra como método de mejora de la vía vaginal en inseminación artificial. *Tesis Doctoral, Universidad de León, España.*
- Bunch T.D. y Ellsworth H.S. (1981):** Gross anatomy of the ovine cervix. *Int. Goat and Sheep Res. 1(4), 282-285.*
- Campbell J.W., Harvey T.G., McDonald M.F. y Sparksman R.I. (1996):** Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriog. 45(8), 1535-1544.*
- Cappai P., Sanna S.R., Branca A., Fraghi A. y Bomboi G. (1998):** Comparison of laparoscopic and transcervical insemination with frozen semen in Sarda dairy ewes. *Anim. Sci. 66(2), 369-373.*
- Eppleston J., Salomon S., Moore N.W. y Evans G. (1994):** The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim. Reprod. Sci. 36, 211-225.*
- Fukui Y. y Roberts E.M. (1978):** Further studies on non-surgical intrauterine technique of artificial insemination in the ewe. *Theriog. 10(2), 381-393.*
- Halbert G.W., Dobson H., Walton J.S. y Buckrell B.C. (1990):** The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriog. 33(5), 977-992.*
- Nikolov L., Nestorova J., Hristov M., Ivanova N. y Khristov M. (1997):** The effect of the frequency of insemination and the depth of semen application on the conception rate of ewes. *Biotehnologija-u-Stocarsvu 1, 397-401.*
- Sayre B.L. y Lewis G.S. (1996):** Cervical dilatation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriog. 45 (8), 1524-1533.*
- Smith J.F., Parr J., Beaumont S., Oliver J.E. y Upreti G.C. (1995):** Comparison of cervical, transcervical and laparoscopic insemination of ewes with chilled stored and frozen ram semen. *Proc New Zealand Soc. Anim. 55, 248-250.*
- Trejo G.A. y Corona M.J. (1987):** Anatomía comparada entre el cervix de ovinos y caprinos en relación al depósito instrumental de semen. *Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México, 385.*
- Windsor D.P., Széll A.Z., Buschbeck C., Edward A.Y., Milton J.T.B. y Buckrell B.C. (1994):** Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriog. 42(1), 47-157.*

Optimization of the digestion step for isolating genomic DNA from ram spermatozoa

C Martínez-Rodríguez^{1,3}, L Ordás^{1,2}, S Pérez-Cerezales^{1,3}, R Pérez-Sánchez³, P Herráez^{1,3}, L Anel^{1,2}, P De Paz^{1,3}, F Martínez-Pastor^{1,3}

¹ITRA-ULE, INDEGSAL, ²Animal Reproduction and Obstetrics and ³Cell Biology, University of León, León, Spain

DNA isolation from spermatozoa is a difficult task, because of their chromatin compaction, requiring higher proteinase K (PK) and a reducing agent (dithiothreitol —DT— or β -mercaptoethanol —BM). We aimed to find a quick and safe digestion method for isolating ram sperm DNA using small volumes. Cryopreserved sperm were thawed, diluted in somatic cell lysis buffer and centrifuged. Pellets were distributed in four different digestion buffers, composed of TNE and 1% SDS, plus: K15-BM: 15 U/mL PK, 1% BM; K3-BM: 3 U/mL PK, 1% BM; K15-DTT: 15 U/mL PK, 1% DT; or K3-DT: 3 U/mL PK, 1% DT. Each solution was split among four tubes (100 μ L/tube; 10^7 cells/tube), and each series was incubated at 55 °C for 4, 8, 12 or 24 h. At each time, DNA was extracted using phenol and phenol:chloroform. DNA was precipitated adding NaCl (200 mM) and -20 °C absolute ethanol. DNA was washed in 70% ethanol, dried and resuspended in TE. Samples were run in an agarose gel and bands were visualized. This experiment was replicated 4 times. Band analysis showed that extraction was optimally achieved after 12 h, obtaining defined bands of high molecular weight (150 kbp), with maximum yield for K3-DT. At 24 h, yield was slightly higher, but signs of degradation were evident. We conclude that using 3 U/mL of PK and DT instead of BM, and incubating for 12 h, could be an appropriate method for obtaining DNA from ram spermatozoa. This study was supported in part by the Ramón y Cajal program.

Mechanical effect of speculum on fertility in ovine vaginal artificial insemination.

H De Lima¹; M Álvarez¹, S Alves¹, M Nicolás¹, M Mata², E Anel¹, JC Boixo³, P Paz² & L Anel¹.

¹Animal Reproduction and Obstetrics, ²Molecular Biology; University of Leon, Spain; ³CENSYRA, Spain.

Fertility in ovine artificial insemination (AI) vaginal via increases with insemination depth. To achieve this it is necessary to visualize the externe uterine orifice (EUO) with a speculum. Speculum causes vaginal contractions that can interfere with fertility. The aim of this work is to study the effect of the mechanical dilatation that the speculum produces on fertility in vaginal insemination.

We used 311 adult sheep from Assaf breed synchronized with intravaginal sponges (FGA-14 days; 40mg Chronogest, Intervet) and 500 UI of eCG (Folligon, Intervet). AI is done at 55±1 hours after sponge removal with a straight catheter. We use two methods: 1) cervical insemination (control group): with sheep lifted (45°), speculum introduction, EUO location and dose placing into cervix as deep as possible; and 2) vaginal insemination with dilatation induced by speculum, sheep lifted and keeping the speculum (opened for 1 minute) in the vagina, then dose placing at the bottom of the vagina (blind AI group). Semen is collected from adult males and diluted to 1600×10^6 spz/ml, refrigerated to 15°C and placed into 0.25 ml straws.

Fertility is significantly higher with cervical AI (51.16%) than with blind vaginal AI (31.25%). The mechanical effect of the speculum reduces fertility in vaginal insemination without location of EUO, but

when the semen dose is placed into the cervix this negative effect is compensated for the insemination depth.

Supported by CYCYT (AGL2005-07601/GAN), Diputación de León and ASSAF.E.

Effect of five extenders on the fertility of refrigerated ram semen

J Muro¹, M Alvarez¹, V García-Macias¹, F Martínez-Pastor^{1,2}, N González¹, J Bernardo¹, S Gomes¹, E Anel¹ and L Anel¹

¹*Reproduction and Obstetrics, University of León, Spain;* ²*IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Albacete, Spain*

The use of cooled semen for inseminating ewes is an important tool for the expansion of vaginal AI in ovine cattle. Many authors have analyzed the effect of many extenders on fertility, obtaining very diverse results. The aim of this work is to test the suitability of five extenders for maintaining the fertility of refrigerated semen from rams of the Assaf breed. We compared the fertility at lambing of ewes inseminated by vaginal AI (365 inseminations and 19 rams). Semen (19 rams) was diluted with 5 extenders (400·10⁶/straw): 2 commercial: Andromed (AND; Minitüb, Germany) and INRA96 (IMV, France); and 3 prepared in our laboratory: UL (Tes-Tris-fructose, 10% egg yolk), LDL (Tes-Tris-fructose, 8% low density lipoproteins from egg yolk) and DCO (Tris-citric acid-fructose). Semen doses were kept 6 h at 15°C. The number of inseminated ewes (total: 365) with each extender was: AND: 60; INRA96: 85; UL: 90; LDL: 56 and DCO: 74. Fertility results at lambing were analyzed by categorical analysis. Fertility was not significantly affected by extender, although AND, INRA96 and LDL seemed to render better results (AND: 45.0%; UL: 33.3%; INRA96: 41.2% and LDL: 41.1% and DCO: 32.4%). It would be interesting to study the effect on fertility of these extenders at other temperatures (i.e. 5°C). Due to the absent of differences we propose the use of extenders without animal protein in their composition such as AND.

This work was supported in part by Diputación de León.

Use of two phospholipids sources from soybean to improve liquid storage of ram spermatozoa

J Bernardo¹, M Mata², M Alvarez¹, C García², J Tamayo¹, E Anel¹, L Anel¹ & P Paz².

¹*Animal Reproduction and Obstetrics,* ²*Molecular Biology; University of Leon, Spain.*

Extenders used for semen preservation at low temperatures contain ingredients (egg yolk) that provide a suitable environment for spermatozoa. The main benefit of egg yolk is that it prevents the loss of membrane phospholipids, thus increases the tolerance to the cooling process. The egg yolk, however, represents several risks, and this fact had led to the replacement of egg yolk with soybean extract. We have assayed two sources of soybean (S20 and S95, complex or simple mixture of phospholipids respectively) to prepare the refrigeration extenders of ram spermatozoa based on TesT-Fructose. As control we use an extender containing TesT-Fructose and egg yolk 10% (v/v) (Anel et al., 2003, *Theriogenology* 63:1235-47). Samples were diluted down to 1600×10⁶ spz./mL, refrigerated (5°C) and stored during 48 h. Then, sperm motility was assessed using CASA system. Also sperm viability and mitochondrial membrane potential were analyzed by means of fluorescence probes using flow cytometer. Our results show high values of sperm motility, sperm membrane integrity and mitochondrial membrane potential when complementing extenders with S20 (2 and 3.5%) similar to those of control extender (egg yolk). Extenders supplemented with S95 (2 and 3.5%) were detrimental for motility, membrane stability and mitochondrial status of spermatozoa. It is still to be probed if these soybean phospholipids show a protective effect similar to egg yolk considering other characteristics of sperm quality.

Supported by CICYT (AGL2005-07601).

The cervix in sheep and Iberian red deer does: structure and challenges for artificial insemination

F Martínez-Pastor¹, M Alvarez², M Kaabi², C Chamorro², JJ Garde¹ and L Anel²

¹*National Wildlife Research Institute (IREC) (UCLM-CSIC-JCCM), Albacete, Spain.*

²*Animal Reproduction and Obstetrics, University of León, León, Spain*

The uterine cervix of small ruminants presents a complex structure, being an obstacle for artificial insemination via vagina. Our group has studied the sheep cervix both to defining its morphology and to improving transcervical insemination. We found a great variability between breeds and individuals. Thus, the opening to the vagina could be classified in seven different types, not being related to the cervix internal structure. The cervix presented generally four internal rings or folds, of which the second one was often eccentric. Its mean length and width (cm) and number of folds were: 7.1/1.4/3.8, 7.4/1.3/4.6, 6.9/1.4/4.0, and 6.1/1.3/4.5 for the breeds Merino, Assaf, Castellana and Churra, respectively. Cervical penetration with a catheter was deeper in breeds with wider cervixes and less folds. Bent tips designed

following the morphometry study allowed for deeper inseminations than commercial catheters (straight or slightly bent). Fertility rose with insemination depth, but it dropped when the catheter reached the proximal region of the cervix. Our preliminary studies on the cervix of Iberian red deer females indicate that the general structure is alike to that of ewes, although length and number of rings are larger. Transcervical insemination is possible, but requires a long time. These studies are useful to enhance cervical insemination fertility in small ruminants, a requirement for the improvement of the breeding of these species.

Evaluation of different lipid sources in frozen-thawed ram semen

Alvarez M.¹; Bernardo J.¹; Boixo J.C.¹; Gomes S.¹; Mata, M.²; Anel E.¹; de Paz P.²; Anel L.¹

¹Animal Reproduction and Obstetrics, ²Cell Biology University of León, Spain.

The use of substances free of animal proteins in semen extenders is an important tool to improve the healthy conditions of ovine reproduction programmes. Hygienic control and chemical composition of extenders are important factors that affect the spermatozoa lifespan. Egg yolk provides protection against cold shock and particularly the low density lipoprotein fraction is the responsible of this effect. Other lipoproteins have been demonstrated to be good cryoprotectants (soy bean) but their use is limited.

The aim of this study is to test the fertility of frozen-thawed semen from Churra breed rams, cryopreserved with four extenders (different source of lipids).

Extenders were made with different sources and concentrations of lipids: egg yolk (UL), low density lipoproteins (LDL), soy lecithin 1% and soy lecithin 2% (granulated commercial soy bean).

Semen from ten rams (two consecutive semen collections per session, two sessions) was evaluated (volume, mass motility and spermatozoa concentration). For each ram, the two ejaculates of a session were pooled if both had good quality. Thus, the final ejaculate was divided in 4 aliquots and diluted (1:1) with the 4 freezing extenders: UL (TesT-fructose-10% egg yolk -4% glycerol- antibiotics), LDL8 (TesT-fructose-8% LDL-4% glycerol- antibiotics), SOY1 (TesT-fructose-1% soy -4% glycerol- antibiotics) and SOY2 (TesT-fructose-2% soy-4% glycerol- antibiotics). The samples were cooled at 5°C (-0.25°C/min) and extended to a final concentration of 100x10⁶ spermatozoa/ml. Diluted semen was placed into 0.25 ml straws, sealed and frozen from 5°C to -100°C (-20°C/min) in a programmable cell freezer (Kryo 10, Planer). The straws were plunged into liquid nitrogen until analysis and thawed in a water bath (65°C 6 s).

The fertilizing capacity was evaluated by laparoscopic intrauterine insemination. The oestrous of the ewes were synchronized using intravaginal sponges with 40 mg fluorogestone acetate (14 days) and 500 UI of eCG (im) at withdrawal. Laparoscopic inseminations were performed at 64 h after the removal of the sponges. The number of inseminated ewes (total 576 from four farms) with each extender was: UL (144), LDL8 (146), SOY1% (146) SOY2% (140).

Fertility was not significantly affected by freezing extender, although UL and LDL seemed to show better results (UL: 43.06%; LDL: 49.32%; SOY1: 41.78% and SOY2: 40.71%). The lipid sources assayed are suitable for freezing the ram semen applied by intrauterine insemination.

This work was supported in part by CYCYT (AGL2005-07601/GAN), Ovigen, Diputación de León and ASSAF.E.

Sperm DNA status does not explain fertility variations in cervical AI when using semen from selected rams

M Álvarez¹, V García-Macías¹, P Paz², F Martínez-Pastor^{1,3}, M Nicolás¹, E Anel¹ and L Anel¹.

¹Animal Reproduction, ²Cell Biology and Anatomy, University of León, León, Spain, ³IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Albacete, Spain

A relation between DNA fragmentation and fertility has been established in human and bull sperm but we have no references in ram. The aim of this study is to describe DNA status in sperm from selected rams and to determine if it is related to their fertility. Ejaculates from 21 adult rams (Assaf breed; selected for breeding) were used for vaginal AI (previously diluted and kept 6 h at 15°C). Fertility of 5545 inseminations was calculated based on post partum results and males were classified accordingly to this in three groups: high (H; >35%; n=8), medium (M; 30-35%; n=5) and low fertility (L; ≤30%; n=8). We analyzed one ejaculate of each male by SCSA (Evenson, 2002; J Androl; 23:25-43). Standard deviation of DNA fragmentation index (SD-DFI) and total DFI (DFIt) were calculated in each case. We compared SCSA results between fertility groups using the Wilcoxon test. Median and interquartil range are shown. Both SD-DFI (L: 2.35, 1.11; M: 1.77, 0.33; H: 1.97, 1.16) and DFIt (L: 0.3, 0.24; M: 0.28, 0.11; H: 0.26, 0.30) were lowest in L group but no statistical differences were found. In general, results indicated highly condensate chromatin. In this study, the differences in fertility between males were not related to DNA status. Good chromatin status was probably due to the selection of the males for breeding; thus, in this case, fertility variation is caused to other factors. Supported in part by Diputación de León.

