

CAPÍTULO 3

Inseminación Artificial

*Carlos Alberto Seillant, María Verano Gómez y Andrés
Telésforo Soto*

Generalidades

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología reproductiva en la cual, mediante un instrumental específico, se introduce una dosis de semen en el sistema genital de la hembra de manera artificial, sin contacto directo entre el macho donante y la hembra receptora.

El proceso de IA tiene el objetivo de mejorar la productividad del hato o majada a través de la mejora genética. De esta manera es posible la utilización de material genético superior a partir de machos, presentes o no, en el establecimiento. Además, la implementación de la IA tiene ventajas como la de prevenir el ingreso de enfermedades de transmisión sexual, permitir el uso de machos que no son del establecimiento, disminuir los costos de inversión en genética, incrementar la presión de selección y disminuir el número de reproductores machos en el hato o majada, utilizar machos incapacitados temporalmente, mantenimiento de registros seguros (paternidad), evitar interacciones sociales, como la dominancia entre los machos o de preferencia sexual macho-hembra que pueda presentarse en determinados casos y su empleo en otras biotecnologías reproductivas (ej: transferencia de embriones). Sin embargo, a pesar de que es una técnica con grandes ventajas en su aplicación, presenta algunas desventajas que deben ser tenidas en cuenta al momento de su implementación. El costo de la técnica y la necesidad de personal entrenado son los dos factores más importantes que influyen en la decisión al momento de plantear la utilización de la IA. El costo está relacionado con el protocolo de sincronización de celos utilizado, con el método de conservación del semen y con la técnica de IA a utilizar (vaginal profunda, cervical, intrauterina laparoscópica). También, existe el riesgo de consanguinidad cuando se emplea la IA, principalmente en hatos o majadas pequeños, al utilizarse semen de un mismo animal en un número importante de hembras y en años sucesivos. Otra desventaja, si bien no debiese ocurrir, es que el semen se encuentre infectado y por ende el proceso de IA actuaría como diseminador de la enfermedad. Finalmente, el porcentaje de gestación que se pueda lograr es variable de acuerdo al protocolo de sincronización, vía de inseminación y conservación de semen utilizados y pueden resultar menor a los obtenidos por servicio natural.

Las diferentes técnicas de IA pueden realizarse con detección de celo (IACD) o en un momento determinado luego de finalizado el protocolo de sincronización, denominándose IA a tiempo fijo (IATF). La IATF se realiza a un tiempo fijo de horas luego de finalizado el protocolo de sincronización y el momento de inseminación depende principalmente del protocolo de sincronización utilizado, la vía y técnica de inseminación.

Consideraciones generales para llevar a cabo la IA

La IA es una serie de procesos que no solo implica la aplicación de una técnica sino que comprende una serie de actividades previas en la majada y situaciones que debemos tener en cuenta para cumplir nuestro objetivo.

Previo al inicio de la sincronización de celos y durante la IA se deberá realizar un control de la majada que incluirá:

- ✓ Destetar los corderos al menos un mes antes de la IA.
- ✓ Estado dentario: solamente deberían inseminarse ovejas con buen estado dentario (Imagen 3.1A).
- ✓ Control de la condición corporal: las ovejas deben estar preferentemente en balance energético (+) y una condición corporal de 2,5 a 3 puntos.
- ✓ Elevado porcentaje de ciclicidad durante la época reproductiva.
- ✓ Control de ubre: ubre sana
- ✓ Realizar despezñado y pediluvios. No incluir aquellos animales que presente enfermedades podales (Imagen 3.1B).
- ✓ Control de enfermedades parasitarias externas e internas por lo menos un mes antes del inicio del trabajo.
- ✓ No inseminar hembras que pudiesen tener síntomas de alguna enfermedad (fiebre, diarrea, secreciones vaginales, entre otros) ya que condicionará los resultados de la IA.
- ✓ Limpieza de cara y región urogenital (Imagen 3.1C).
- ✓ Se deberán evitar los arreos excesivos en días pre y post inseminación, lo cual implica tener un potrero cercano y con buena disponibilidad de forraje destinado para el proceso de IA. El mismo debe tener sombra y agua.
- ✓ Evitar cambios en la alimentación.
- ✓ Es recomendable realizar una ultrasonografía previa a la sincronización de celos con el objetivo de eliminar aquellas hembras que pudiesen tener alguna patología en el aparato genital o bien que se encuentren gestantes por robo.

Imagen 3.1



Nota. A) Determinación del desgaste dentario, boqueo B) Despezuñe C) Esquila previa a la IA de la región urogenital de la oveja (Seillant, C.A.)

En caso de que el proceso de IA lo llevemos a cabo con semen fresco o refrigerado con carneros del establecimiento tendremos en cuenta:

- ✓ Los machos destinados a la IA deberán ser **aptos reproductivos** para lo cual 60 días antes del comienzo de la IA deberán ser revisados (Imagen 3.2 A y B).
- ✓ Se deben evitar cambios en la alimentación y si los hubiese deberán tener un período de acostumbramiento.
- ✓ En épocas calurosas se aconseja que los mismos estén esquilados. De no encontrarse esquilados realizar una esquila de la región urogenital y abdomen.
- ✓ Asegurarse que los carneros acepten el uso de la vagina artificial. Los carneros sin experiencia deberán ser amansados y entrenados para la extracción con vagina artificial.
- ✓ Tener un lugar destinado para la extracción de semen y otro para la evaluación y dilución seminal

Es recomendable contar con al menos dos potreros para el manejo de la majada durante la IA, uno para los animales a inseminar y uno o dos para los inseminados. Preferentemente, se deberá tener un piquete o corral cercano de encierre nocturno para los carneros marcadores. Para facilitar el trabajo de IA es necesario contar con corrales y manga para el aparte de las ovejas en celo, un galpón cubierto con piso de material para la extracción de semen y la realización de la inseminación al resguardo de factores climáticos e instalaciones para la sujeción de la oveja a inseminar mediante cepos giratorios, fijos o bien que permitan una buena sujeción a mano con un ayudante.

Imagen 3.2

Nota. A y B) Examen de aptitud reproductiva del carnero: examen clínico particular de los genitales externos (Seillant, C.A.)

También, durante la planificación previa de los diferentes procesos que conlleva la IA debemos tomar conocimiento del número y calificación del personal con el que contaríamos. Debemos evitar que la IA se realice en un momento inoportuno, por ejemplo, evitar que coincida con otras actividades que puedan presentarse en el establecimiento que conllevaría una disminución en el número del personal auxiliar, o bien un día no laborable o festivo. También, es recomendable tener en cuenta las condiciones climáticas para evitar que el momento de IA e inclusive el de sincronización de celos coincidan con situaciones de estrés térmico. Dependiendo de las instalaciones que tenga el establecimiento, de ser posible, otras situaciones climáticas como lluvias o vientos fuertes debieran tenerse en cuenta para la planificación de los procesos de IA. Se recomienda que la planificación se realice retrospectivamente, primero determinando el día de IA y a partir de allí planificar el protocolo de sincronización de celos y la obtención de dosis inseminantes.

En el caso de la IACD es necesario realizar la detección celos para lo cual se podrá utilizar tanto machos enteros con delantal, carneros vasectomizados, capones androgenizados u otras alternativas.

Técnicas de inseminación artificial

Acorde al lugar anatómico donde se realiza el depósito de semen y la vía de abordaje, el proceso de IA recibe una denominación específica. La canalización del cérvix en pequeños ruminantes representa una problemática, sea desde la consideración anatómica como por el instrumental que vayamos a utilizar. Es por ello que la vía cervical recibe diferentes nombres acorde a la profundidad en el que se pudo depositar el semen en el útero. También, acorde a la

vía de inseminación es el tipo de semen conservado que vamos a utilizar preferentemente (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1

Vías de inseminación, lugar de deposición y tipo conservación seminal

Vía de inseminación	Lugar de depósito seminal	Tipo de conservación de semen utilizado de preferencia
Vaginal	Vaginal profunda	Fresco
Cervical (cervix)	Exocervical	Fresco
	Cervical	Fresco, refrigerado
	Cervical profunda	Fresco, refrigerado, congelado
	Transcervical (cuerpo del útero)	Fresco, refrigerado, congelado
Transabdominal (laparoscópía)	Cuerno uterino	refrigerado y congelado

El momento óptimo para realizar la IA está relacionado con la vía y técnica de IA, el protocolo de sincronización de celos utilizado y con el tipo de conservación de semen. Los procesos de IA se pueden llevar a cabo mediante la detección de celos (IACD) o en un determinado momento, posterior a la culminación del protocolo de sincronización (IATF). Sin embargo, el momento de la IATF varía acorde a la vía de inseminación sea esta cervical o bien intrauterina laparoscópica. Por otro parte, en pequeños rumiantes, los procesos de IA se podrán llevar a cabo tanto con semen fresco, refrigerado o congelado. Si bien se puede inseminar con cualquier tipo de semen conservado por cualquier vía, de preferencia se utiliza el semen fresco por vía vaginal, fresco o refrigerado por vía cervical y semen congelado en la IA laparoscópica. Los motivos de esta asociación entre la vía de inseminación y el tipo de conservación radica en que la vía cervical resulta una técnica sencilla, económica, de buenos resultados generales de primoinseminación con semen fresco ($\geq 50\%$ de gestación) pero no así con semen congelado ($\geq 20\% \leq 35\%$ de gestación). La vía laparoscópica es de mayor complejidad, requiere de personal profesional y los resultados con semen congelado son siempre superiores a los logrados por la vía cervical ($\geq 40\% \leq 80\%$ de gestación).

A continuación describiremos las técnicas de IA mayormente utilizadas que son la vía cervical y laparoscópica.

Inseminación por vía cervical

La vía cervical es, preferentemente, utilizada con semen fresco y generalmente el mismo es obtenido de carneros del establecimiento inmediatamente antes de la IA. Por ello, cada eyaculado debe ser valorado antes de llevar a cabo el proceso de dilución e inseminación. No obstante, también se puede utilizar semen refrigerado o congelado.

Técnica de extracción de semen, valoración del eyaculado y dilución

El eyaculado ovino o caprino se obtendrá mediante la técnica con vagina artificial o en caso de ser necesario, ya sea por rechazo de la vagina artificial o por una impotencia coeundi extragenital adquirida, por electroeyaculación.

Para la extracción de semen con vagina artificial debemos contar con un cepo, un súcubo, el macho dador de semen y una vagina artificial. El súcubo es el animal, generalmente una oveja, sobre el cual salta el carnero.

La vagina artificial consta de dos tubos, uno externo rígido de 15 a 25 cm de longitud y uno interno flexible de látex de mayor longitud que permite doblar los extremos y sujetarlos con bandas de goma, determinando un espacio libre entre ellos. A través de una válvula o de uno de los lados se introduce agua a 60 -70°C para que, al momento de la extracción, el interior alcance una temperatura de 40-42°C para lograr la eyaculación.

La presión se regula por medio de la introducción de aire por la válvula. En un extremo de la vagina se coloca una copa de vidrio graduada seca y limpia para la recolección del eyaculado, la cual está cubierta por un protector que protege el eyaculado de los rayos UV, golpes y de las bajas temperaturas evitando la muerte de espermatozoides por shock térmico (Imagen 3.3).

Para la extracción, la oveja se inmoviliza en el cepo (puede ser cepo o brete al ras del piso o elevado), el cual estará sujeto preferentemente sobre un piso de cemento (Imagen 3.4 A). El operario acerca al carnero hacia la región caudal de la hembra. Generalmente, el carnero reacciona oliendo la región vulvar y realizando el reflejo de Flehmen. Para incrementar el grado de excitación sexual, el operario puede realizar dos tipos de maniobras: la falsa monta y la retracción al salto. La retracción al salto ocurre cuando el macho al momento de saltar, para realizar la monta, se lo retira y la falsa monta consiste en dejar montar al carnero y lateralizar el pene por el prepucio impidiendo la penetración. Estas maniobras, preferentemente, no deben realizarse en más de tres ocasiones. Finalmente, el operario se coloca al lado de la oveja, dejando al carnero realizar la monta, desviando el pene por el prepucio hacia la vagina artificial permitiendo la introducción, estocada y eyaculación (Imagen 3.4B).

Si el macho introduce el pene y no eyacula habrá que corregir las condiciones de temperatura o de presión de la vagina artificial. Se deberá constatar que de que la temperatura no sea elevada ya que podríamos quemar la mucosa peneana.

La frecuencia de extracción debiera ser de dos a tres eyaculados por día a intervalos mayores a quince minutos.

Imagen 3.3



Nota. Partes constitutivas de una vagina artificial tipo danesa: camisas externas (A); camisa interna de látex (B); conos intermediarios de recolección de látex (C); diferentes tubos graduados de recolección (D) (Seillant, C.A.)

Imagen 3.4



Nota. A) Súcubo sujeto en un brete de salto B) Momento de la extracción de semen con vagina artificial por parte de un operario (Seillant, C.A.)

Luego de la obtención del eyaculado, debe evaluarse al mismo macro y microscópicamente y de ser necesario se realizarán tinciones espermáticas. Todo el material utilizado durante la evaluación deberá estar atemperado y el semen conservado en baño María a una temperatura de 37°C.

El examen macroscópico comprenderá la evaluación de los siguientes parámetros: el volumen, el aspecto, pH, motilidad de masa macroscópica y la presencia de cuerpos extraños. El examen microscópico comprenderá la concentración, la motilidad de masa microscópica, la motilidad individual y el vigor.

La lectura del volumen se realiza directamente en el tubo de recolección graduado, sin tener en cuenta la espuma que pudiese existir. El aspecto del semen está dado por el color y la densidad, requiriéndose eyaculados blancos lechosos a cremosos para el uso en IA (Imagen 3.5 A). El pH del semen es ligeramente ácido (pH=6,7-6,9) y se puede medir con una cinta indicadora colocando una gota de semen sobre la misma. El semen puede estar contaminado por elementos propios del animal (materia fecal, pus, sangre u orina) o externos (tierra, pasto, talco, entre otros), los cuales generalmente producen un cambio de coloración en el semen (Imagen 3.5 B).

Imagen 3.5



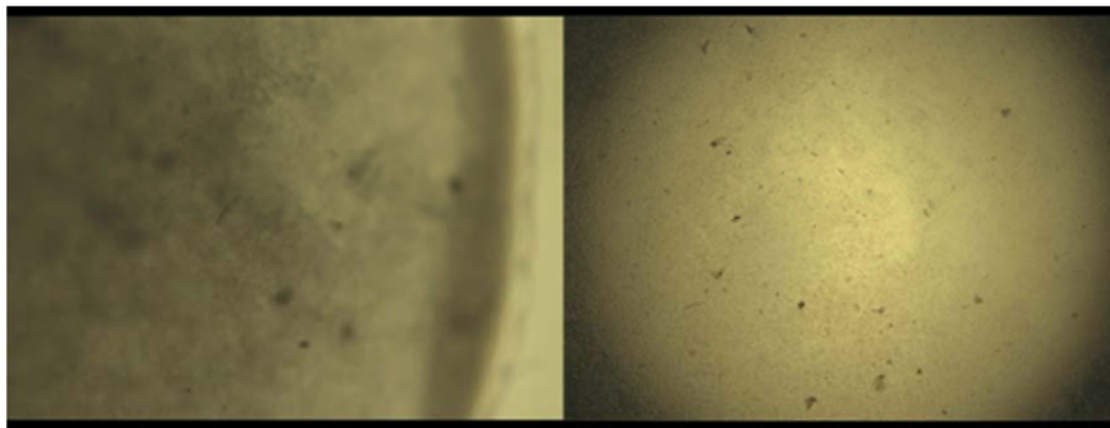
Nota. A) Eyaculado normal blanco cremoso B) Eyaculado hemospérmico (Saillant, C.A.)

El examen microscópico del semen fresco comprende dos tipos de evaluaciones, una con semen puro y otra con semen diluido.

Para el examen del semen puro se colocará una gota de semen puro en un portaobjeto sobre la platina térmica (37-38°C) y se observa a 40x totales (lupa). En la evaluación de la motilidad de masa microscópica se observará la formación e intensidad con que se arman y desarman las ondas (Imagen 3.6). Cuanto más rápido se arman y desarman estas ondas mayor será la motilidad y vigor de los espermatozoides (valoración subjetiva). La amplitud de las ondas nos indica la concentración espermática (valoración subjetiva). Cuánto más finas son menor es la concentración espermática. Sin embargo, si queremos saber el número de espermatozoides con mayor exactitud debemos realizar el conteo en una cámara cuenta

glóbulos o cualquier otro método de conteo. Los espermatozoides muertos se observarán principalmente en el borde de la gota (valoración subjetiva). Sin embargo, preferentemente debe ser valorado a través de una coloración vital (método objetivo). Generalmente, se utiliza una escala de valoración de 1 a 5, siendo este último el valor máximo.

Imagen 3.6



Nota. Motilidad de masa microscópica: se observan ondas espermáticas gruesas (izquierda); ausencia de ondas y abundante presencia de cuerpos extraños (derecha) (Soto, A.T.)

Para realizar la evaluación del semen fresco diluido se debe colocar en un tubo una gota del eyaculado y dos o más gotas de un diluyente isotónico (por ejemplo: citrato de sodio 2,9%) y se colocará una gota de esta dilución, previamente homogenizada, entre cubre y portaobjeto sobre platina térmica y la observación se realizará a 100x y 400x aumentos totales. Se valorará el tipo de movimiento de los espermatozoides, el cual se expresa como el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo, y el vigor. Se define como vigor a la intensidad de movimiento de los espermatozoides y se evalúa en una escala subjetiva de 0-4.

La determinación de la concentración objetiva puede realizarse a través del recuento con una pipeta de glóbulos rojos y cámara Neubauer. De no contar con una pipeta de glóbulos rojos se procederá a realizarse una dilución conocida en un tubo.

En la siguiente tabla se presentan los valores seminales mínimos aceptables para algunos de los parámetros mencionados anteriormente, para la utilización del eyaculado ovino y caprino tanto fresco como refrigerado a una temperatura de 5°C o 15°C.

Una vez valorado el semen debe ser conservado a 30°C en baño María o en un termo hasta el momento de la inseminación. El semen fresco puede ser utilizado puro o bien diluido con diluyentes a base Tris, citrato y yema de huevo o leche descremada. Para la inseminación con semen fresco por vía cervical se emplean dosis conteniendo 50-200x10⁶ espermatozoides y un volumen de 0,1ml o menor. En caso de que el semen vaya a utilizarse refrigerado a 5°C, el mismo será diluido con leche descremada o medios sintéticos de tal forma que cada dosis contenga 100-300x10⁶ espermatozoides totales.

Tabla 3.1*Valores seminales mínimos aceptables para su uso fresco o refrigerado*

Parámetro	Valor mínimo aceptable
Volumen	0,5 ml
Aspecto (concentración subjetiva)	Cre moso tenue (2,5-3,5x10 ⁹ espermatozoides/ml)
Concentración (objetiva)	2,5 x10 ⁹ espermatozoides/ml
% de espermatozoides vivos	70%
Motilidad progresiva individual	70%
Vigor (0-4)	3 (motilidad progresiva rápida)

Proceso de inseminación artificial por vía cervical

Para llevar a cabo el proceso de IA vaginal o cervical debemos considerar en primer término las instalaciones con las cuales debemos contar. De preferencia, debemos contar con un sitio que tenga varios corrales para facilitar el manejo de las hembras pre y pos inseminación y la sujeción de las mismas lo cual contribuye a una mayor eficiencia laboral y al bienestar animal.

La inmovilización de la hembra durante la IA es de suma importancia para lograr una labor eficiente por parte del veterinario en relación al número de animales inseminados por jornada, una situación mínima de estrés para el animal y evitar lesiones tanto en la hembra como en los operarios. La sujeción de la hembra se podrá realizar tanto en forma manual o mediante un brete. La sujeción manual se realiza de manera tal que la hembra quede con el tren posterior apoyado sobre la última tabla de la manga o la empalizada del corral a una altura de 80-90 cm, sujeta de ambos miembros posteriores por las manos del operario y apoyando los miembros anteriores en el piso y sujeta por el cuello entre las piernas del operario. De esta manera, se logra que el animal esté a unos 45° o más con respecto al piso, lo cual permite un desplazamiento hacia craneal del aparato genital lo que facilita la realización de la vaginoscopía, la visualización del orificio cervical, la cateterización del canal cervical y la posición del inseminador (Imagen 3.7 A, B y C).

Los bretes de sujeción preferentemente deben estar adyacentes a una fosa (Imagen 3.8 A) o bien elevados (Imagen 3.8 B) para facilitar la tarea del inseminador, ya que de esta manera no debe agacharse y su vista es directa a la región urogenital de la hembra.

Es recomendable que el lugar donde se procesará el eyaculado o la pajueta esté al reparo del viento y de los rayos solares. Previo a la IA debe identificarse y registrarse la hembra a inseminar, así como el macho dador de semen en el caso de utilizar el eyaculado de animales propios del establecimiento o bien los datos correspondiente a las pajuetas.

Imagen 3.7



Nota. Sujeción de la oveja sobre empalizada del corral A) Previo a la higiene de la región urogenital (Soto, A.T.) B) Durante la higiene urogenital (Seillant, C.A.). C) Durante el proceso de inseminación artificial (Seillant, C.A.)

Imagen 3.8



Nota. A) Brete de inseminación con fosa. B) Brete de inseminación elevado (Seillant, C.A.)

El instrumental básico para realizar la IA estaría compuesto por:

- un espéculo vaginal tipo de pico de pato (bivalvo) (Imagen 3.9 A y B) o un vaginoscopio (Imagen 3.9 C y D) preferentemente con luz incorporada o con fuente externa.
- Una pipeta o pistola de inseminación, multidosis (Imagen 3.10 A y B) o monodosis (Imagen 3.10 C y D).
- Elementos de limpieza para la región urogenital (torundas húmedas, toallas de papel para secado, entre otros).
- En caso de usar semen congelado será necesario contar con un baño María o un termo de nitrógeno, tijeras, toallas de papel, pinza para el manejo de las pajuelas y alarma entre otros.

Las pipetas o pistolas monodosis pueden ser empleadas tanto con semen fresco como refrigerado y tienen la ventaja de que se puede lograr una mayor penetración en el canal cervical El extremo (tip) se reemplaza en cada inseminación por lo que se incrementa la higiene

y disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades (Imagen 3.10 C). Para realizar la IA cervical con semen congelado debemos recurrir a la pistola universal o de Caseaux con su correspondiente vaina protectora las que se reemplazan en cada inseminación (Imagen 3.10 D). Las pistolas multidosis constan de una cánula larga que mediante un embolo, accionado por una varilla dentada, permite descargar dosis de 0,1 ml. Si bien son prácticas, tienen la limitante de que solo se pueden realizar inseminaciones exocervicales (Imagen 3.10 A y B).

Imagen 3.9



Nota. A y B) Espéculo bivalvo sin fuente de luz en posición abierto (A) y cerrado (B). C) vaginoscopio con fuente de luz. D) Operador realizando una vaginoscopia (Gómez, M.V.).

Imagen 3.10



Nota. A) Pistola de inseminación multidosis para semen fresco y refrigerado. Se observa el extremo inseminante que corresponde a una pipeta de vidrio. B) Pistola de inseminación multidosis con su vaina protectora (negra) la cual tiene la función de evitar el shock térmico y de proteger de los rayos UV a las dosis inseminantes, además de proteger a la pipeta de vidrio de golpes que podrían causar su rotura. C) Pistola monodosis de elaboración casera para semen fresco y refrigerado. D) Pistola monodosis universal de Caseaux (Gómez, M.V.; Seillant, C.A.; Soto, A.T.)

Técnica de inseminación artificial

Antes de dar comienzo a la descripción de la técnica de la inseminación cervical realizaremos una reseña del aparato genital de la hembra, lo cual nos permitirá indicar el lugar de depósito de la dosis inseminante acorde a la técnica.

Reseña del aparato genital de la hembra

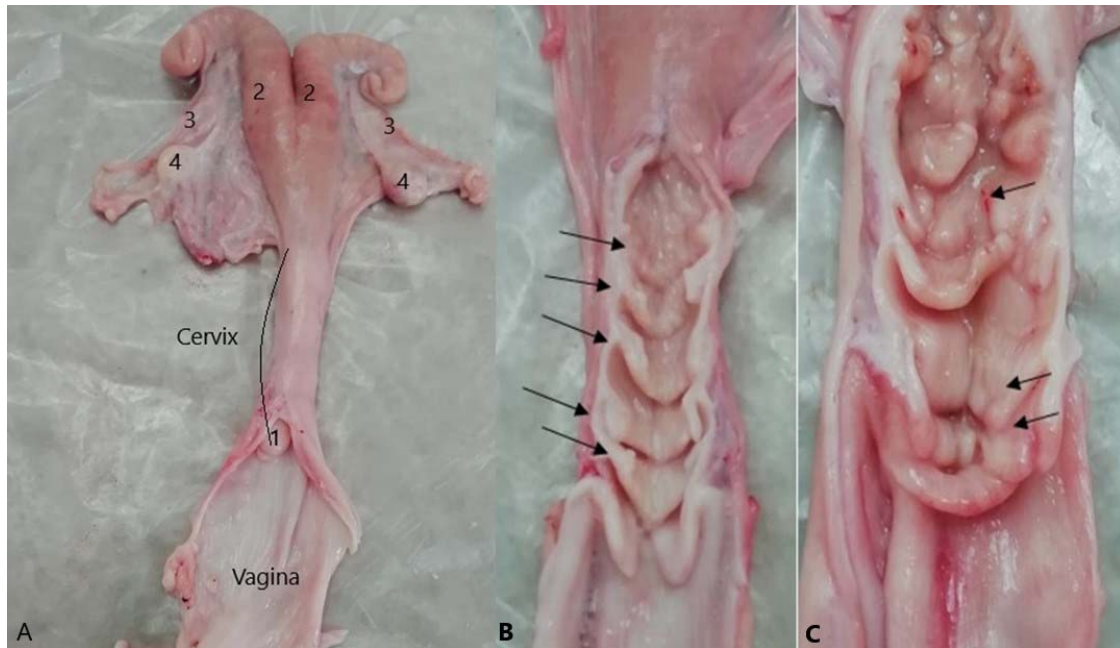
El aparato genital de la hembra ovina y caprina está compuesto por la vulva y su vestíbulo, la vagina, el útero; las trompas de Falopio y los ovarios (Imagen 3.11 A). El útero comprende el cuello o cérvix uterino, un pequeño cuerpo y dos cuernos. La vagina mide aproximadamente 8 cm de longitud, el cérvix varía en su largo entre 5 a 10 cm, el cuerpo no mayor a 2cm y los

cuernos uterinos tienen 10-12 cm de longitud. Tanto el cuello uterino de la oveja como el de la cabra presentan entre 5-7 pliegues cervicales o anillos fibrocartilaginosos que no se encuentran alineados ni son completos, con una forma similar a un cono truncado orientado hacia la vagina, lo cual produce una disminución del espacio cervical y un trayecto sinuoso del mismo (Imagen 3.11 B y C). Así mismo, la os cervical u orificio cervical caudal presenta, generalmente, cuatro tipos de formas básicas debido a la presencia o no de pliegues. Estas formas se clasifican en: pico de pato, flap (o tapa), roseta y espiral.

Lugar de deposición de la dosis inseminante

La inseminación artificial cervical consiste en el depósito del semen en el cuello uterino a la mayor profundidad posible, lográndose, en ocasiones, atravesar por completo el canal cervical (IA intrauterina transcervical). Sin embargo, el grado de penetración cervical no solo es dependiente del diámetro y forma del canal cervical sino que también es dependiente del instrumental a usar. Dependiendo del instrumental y de las características particulares de cada cérvix se podrá lograr una mayor o menor profundidad de siembra.

Imagen 3.11



Nota. A) Partes constitutivas del aparato genital de la hembra: os cervical (1), cuernos uterinos (2), trompas de Falopio (3) y ovarios (4). B) Cuello uterino ovino con anillos completos (flechas) y canal cervical recto de mayor facilidad de atravesarse. C) Cuello uterino ovino con anillos incompletos (flechas) y canal cervical sinuoso (Gómez M.V.)

Cuando la IA se lleva a cabo sin el auxilio de un vaginoscopio o espéculo para la localización del cérvix, la dosis inseminante se depositará en el fondo de la vagina en la cercanía del cérvix denominándose a esta técnica *vaginal profunda* (Imagen 3.12 A). De contarse con un vaginoscopio o un espéculo se podrá observar y localizar el orificio cervical y por ende tratar de canalizar al mismo si el tipo de instrumental lo permite. Cuando la deposición de la dosis seminal se realiza alrededor o en la os cervical, o bien se penetra levemente en el canal se denomina IA *exocervical* (Imagen 3.12 B y C)

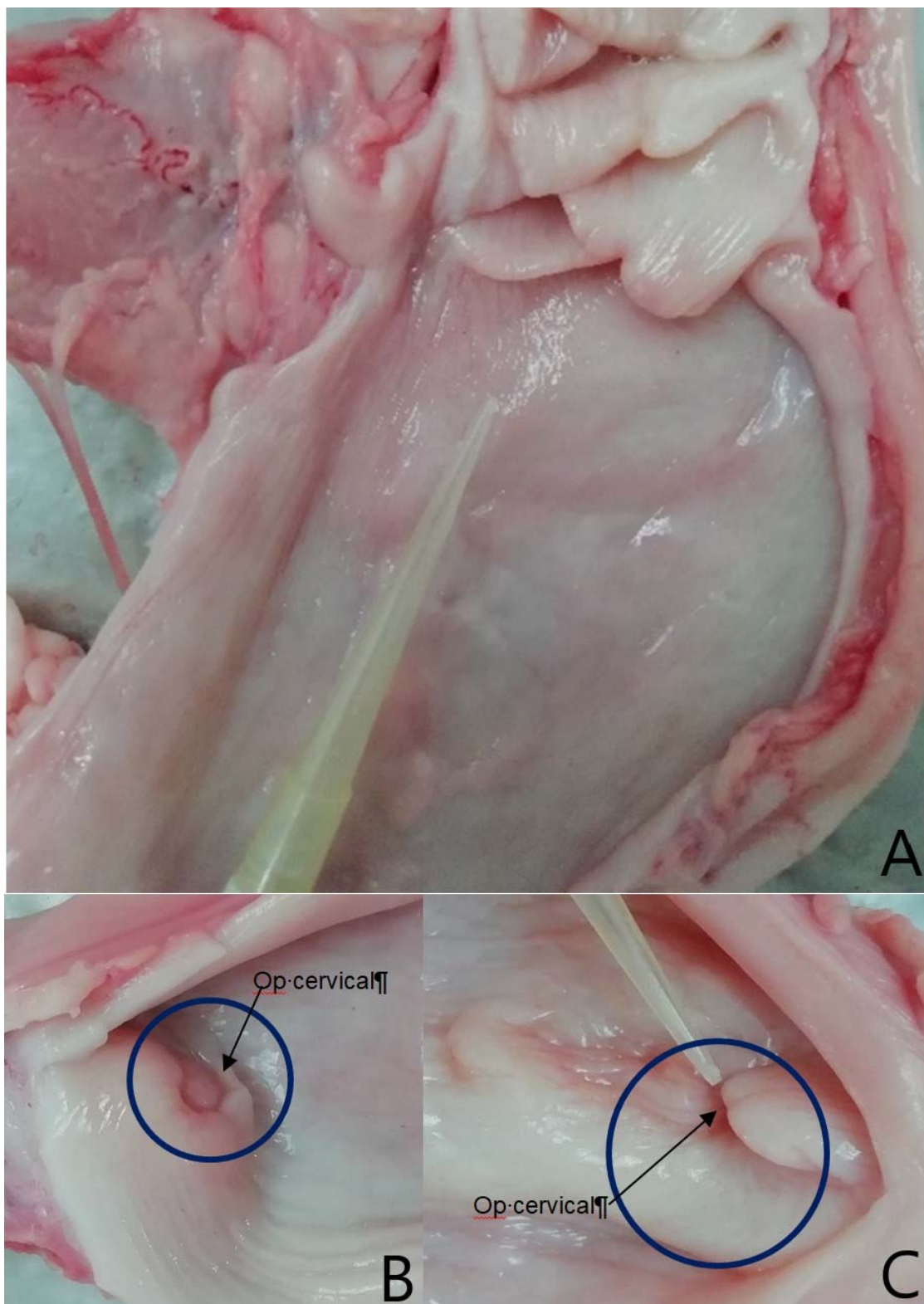
Acorde al grado de penetración que se logre cateterizar del cuello uterino, la IA se denominará *cervical*, cuando se logre atravesar el primer pliegue cervical y no más allá del segundo (Imagen 3.13 A y B), *cervical profunda* cuando el grado de penetración supere el 3 anillo cervical (≥ 4 cm) (Imagen 3.13 C) y cuando se logre traspasar el cérvix y depositar el semen en el cuerpo del útero denominaremos a la técnica como *transcervical intrauterina*.

Una de las técnicas para realizar la IA transcervical intrauterina es el denominado método Guelph. Para realizar este tipo de IA, la hembra puede sujetarse en estación en un brete o en una camilla en decúbito dorsal. Si bien no es un método muy utilizado en la práctica; para llevarlo a cabo se introduce un espéculo y se localiza el cérvix, el cual se sujeta con un par de fórceps de Bozeman y se realiza la tracción del cérvix hacia la vulva. De esta manera, se logra una mayor visualización y apertura del orificio cervical y mantener el cérvix con firmeza lo cual permite maniobrar y ejercer mayor fuerza para canalizar el canal cervical. El método Guelph, en líneas generales, permite realizar la IA intrauterina en el 75% de las veces con un % de gestación variable (32-45%) al utilizarse dosis de semen congelado-descongelado. Así mismo, es considerada una técnica cruenta debido a la tracción y a las posibles lesiones y procesos inflamatorios que se podrían producir en el cérvix. El tiempo de ejecución es de 2 a 6 minutos aproximadamente.

Momento de la IA

El momento de la IA dependerá si la misma se realiza a celo detectado (IACD) o bien a tiempo fijo (IATF) y la posibilidad de utilizar una u otra depende del tipo de protocolo de sincronización de celos que se ha utilizado. Los protocolos de sincronización de celos comúnmente utilizados están basados en la aplicación de PGF o del empleo de dispositivos intravaginales impregnados con P₄ o progestágenos (DIV). La aplicación de una o dos dosis de PGF o el uso de DIV solo produce una dispersión de celos durante las 72h posteriores a la última aplicación o retiro del DIV, por lo cual generalmente se realiza la detección de celos previo a la IA. En cambio, los protocolos que permiten el uso de IATF no solo inducen celos sincronizados sino que también provocan la sincronización de las ondas foliculares y el momento de la ovulación, hechos que permiten que la IA se realice en un tiempo determinado. Uno de los protocolos de sincronización de celos mayormente empleado para IATF es mediante el empleo de dispositivos intravaginales impregnados con P₄ o progestágenos junto con la aplicación de eCG.

Imagen 3.12



Nota. La punta del tip amarillo indica el sitio de deposición de la dosis seminal. A) IA vaginal profunda. B) Orificio cervical (op) en forma de roseta (círculo). C) IA exocervical. Orificio cervical en forma de flap o tapa (círculo) (Gómez, M.V.)

Imagen 3.13

Sitio de deposición en la IA cervical



Nota. A) El tip solamente puede penetrar una corta distancia dentro del cérvix. B) Corte longitudinal del cuello uterino donde se visualiza que el tip ha transpuesto el primer anillo cervical C) Sitio de deposición en la IA cervical profunda (Gómez, M.V.)

La IACD por vía cervical se realiza a las 12h luego de detectado el celo de la hembra. En caso de realizar una doble inseminación, la segunda se realizará a las 12h de la primera. La IATF, en términos generales, se realiza a las 50-55h de retirado el dispositivo intravaginal.

Cuando realizamos la vaginoscopía podemos observar las características del mucus cervical, el cual varía sus características durante el celo. El moco cervical inicialmente se presenta claro y escaso, se hace abundante y opalescente (nuboso), y luego se incrementa su densidad siendo espeso, cremoso y finalmente caseoso. La ovulación generalmente coincide con un mucus cervical espeso o cremoso, obteniéndose los mejores resultados cuando el mucus se presenta claro a opalescente y abundante.

Técnica de inseminación

Una vez sujeta y preparada la hembra para el procedimiento de inseminación procedemos a higienizar la región vulvar mediante una torunda humedecida y luego secamos con papel absorbente (Imagen 3.14 A).

El vaginoscopio o el espéculo deben estar limpios, secos y atemperados. Para introducirlo, primero se procede manualmente a la apertura de los labios vulvares y luego se lo introduce en dirección al techo y fondo de vagina (cráneo-dorsal) con suaves y leves movimientos rotatorios en forma paralela a la columna vertebral. Los espéculos deben ser introducidos con las valvas cerradas coincidiendo su eje mayor con el eje vulvar y deben retirarse abiertos para evitar pellizcar la mucosa vaginal (Imagen 3.9 A y B). Puede ocurrir que el animal orine durante la sujeción o al introducir el vaginoscopio. Si la orina se acumula en la vagina se eliminará por completo y se procederá a lavar con solución salina o en su defecto separaremos la hembra para su posterior inseminación. También, si en el fondo de la vagina hubiese abundante mucus que impidiera ver el cérvix, se lo extrae con una pipeta adosada a una pera de goma o una jeringa de 10ml y procedemos a ubicar el orificio cervical. Mientras se realiza la vaginoscopía, un auxiliar cargará la pistola multidosis con las dosis inseminantes o bien una dosis de 0,1ml con la pipeta monodosis (Imagen 3.14 B). El instrumental deberá estar atemperado a una temperatura similar a la cual están mantenidas las dosis seminales. Durante la carga de las pipetas monodosis, en primer término procederemos a cargar una columna de aire de aproximadamente 0,2ml previo a la carga de la dosis seminal. El aire tiene la función de expulsar toda la cantidad de semen presente en la pipeta. Luego de la carga, el auxiliar entrega la pipeta o pistola al inseminador quien coloca la misma dentro del vaginoscopio.

Una vez reconocido y localizado el orificio cervical (Imagen 3.14 C y D) se introduce la pistola de IA por dentro del vaginoscopio y se intenta penetrar el cérvix. Como se mencionó con anterioridad con la pistola multidosis no se puede canalizar el cérvix o no más allá de 0,5cm; por lo cual la inseminación será de tipo exocervical (Imagen 3.14 E). Con las pistolas monodosis se podrá canalizar el cérvix en una profundidad variable, buscando sortear los anillos cervicales hasta que se encuentre un impedimento para continuar. Al encontrar un tope se retira levemente el instrumental para evitar el reflujo seminal y se descarga la dosis de

semen. Esta última maniobra también la realizaremos con las pistolas multidosis, evitando así el reflujo de la dosis inseminante. Por último, luego de la deposición seminal, se retira el instrumental junto con el vaginoscopio (Imagen 3.14 F). La cateterización del canal cervical en las cabras suele ser más fácil con respecto a los ovinos, ya que los anillos cervicales mayormente se disponen de manera tal que el canal cervical tiende a ser recto, lineal, por lo cual se logra una mayor profundidad de siembra y en el 30-50% de las ocasiones se logra inseminar intrauterinamente. Sin embargo, el proceso de canalización podría estar limitado por el tamaño del cérvix de algunas razas caprinas.

Imagen 3.14



Nota. A) Limpieza de la región vulvar. B) Pistola de inseminación multidosis cargada con semen diluído. C) Vaginoscopía. D) Localización y observación del os cervical E) Momento de la IA. F) Retiro conjunto del vaginoscopio y pistola de inseminar (Fernández Abella, D.H. y Seillant, C.A.)

El vaginoscopio o espéculo, luego de su uso debe ser lavado y secado por completo antes de volver a ser utilizado, para evitar la transmisión de enfermedades entre animales por lo que se recomienda poseer al menos dos vaginoscopios. En caso de que la pipeta o pistola se contaminen durante la IA deben cambiarse por otras limpias y secas. En caso de utilizar las pipetas monodosis se sustituye el tip empleado y en el caso de las pistolas tipo universal para semen congelado se sustituye la vaina protectora.

Inseminación artificial intrauterina laparoscópica

Proceso de inseminación artificial

La vía laparoscópica para la inseminación intrauterina es la vía de preferencia cuando se utiliza semen congelado/descongelado ya que esta técnica quirúrgica evita la barrera del cuello uterino y permite la deposición de la dosis seminal se realice directamente en ambos cuernos uterinos (Imagen 3.15). Así mismo, si se cuenta con el equipo adecuado y personal entrenado es posible inseminar hasta 150 hembras por inseminador. Esta técnica permite obtener porcentajes de preñez superiores a las demás técnicas y con un número menor de espermatozoides por dosis.

Previo a la IA intrauterina laparoscópica, las hembras deben ayunar al menos 12 horas, privándolas de agua y alimento. De ser posible el ayuno sólido debe ser de 24 horas. De esta manera disminuye el contenido ruminal y de la vejiga, lo cual disminuye el riesgo de penetrar los mencionados órganos al utilizar el trócar, permite una mejor visualización del útero y se evita la regurgitación durante el proceso quirúrgico.

Para la IA por vía laparoscópica es recomendable un lugar cerrado o protegido de las inclemencias climáticas. Las hembras deben ser sujetadas de cúbito supino o dorsal por medio de una camilla, la cual posee correas o similar que permite la sujeción de cada miembro y, de ser posible, que esté provista de ruedas para poder realizar la preparación del animal en una zona y la inseminación en otra. La camilla se eleva a 40° o más de manera que la hembra quede inclinada con sus cuartos traseros elevados. Es recomendable poseer al menos dos camillas ya que de esta forma mientras se realiza a inseminación en un animal, se prepara otra hembra en la segunda camilla (Imágenes 3.16 A y B).

Imagen 3.15

Inseminación artificial laparoscópica



Nota. (Gómez M.V.)

Imagen 3.16



Nota. A) Sujeción en la camilla de IA B) Sujeción y posición de la oveja para IA laparoscópica (Gómez MV, 2018)

El instrumental necesario para realizar la técnica de inseminación artificial por laparoscopia consiste en dos (2) trócares, uno de 5mm (para el inyector de inseminación denominado Aspico) y otro de 7-10mm (para el laparoscopio), un inyector de inseminación, un endoscopio, una fuente de luz y una fuente de insuflación de aire estéril o CO₂ (Imagen 3.17). Todo el equipamiento debe encontrarse sumergido en solución estéril.

Imagen 3.17



Nota. 1) Inyector de inseminación 2) Trócares para IA laparoscópica; b: (Gómez, M.V.)

Técnica de inseminación artificial intrauterina laparoscópica

La hembra se coloca de cubito dorsal sobre una camilla, sujetándose los miembros (Imágenes 3.16A) y se inclina a 45° de manera que la cabeza quede hacia abajo (3.16B y 3.20B). De esta manera se logra que las vísceras abdominales se desplacen hacia craneal permitiendo una mejor visualización del útero al momento de la IA. Puede utilizarse una sedación suave para un mejor manejo de la hembra y disminuir el stress animal. Se esquila un área del tamaño aproximado de la palma de una mano por delante de la ubre y se la rasura (Imagen 3.18 y 3.20C). Posteriormente se limpia la piel del área rasurada con jabón antiséptico. Luego se realiza la anestesia local por vía subcutánea con clorhidrato de lidocaína, a unos 5 cm anteriores a la ubre y 4 cm laterales a la línea media, evitando los vasos sanguíneos. En el área anestesiada se procederá a realizar el abordaje de la cavidad abdominal mediante trocarización a ambos lados de la línea media (Imagen 3.18 y 3.20C). Previo a las trocarizaciones puede realizarse una incisión en la piel de 1cm para facilitar la perforación del trócar y ejercer una menor fuerza. La trocarización se realiza colocando el trocar casi en paralelo a la piel y luego, perpendicularmente, se atraviesa la pared muscular del abdomen y el omento mayor. La primer trocarización se realiza con el trocar de 10mm por donde se insuflará la cavidad abdominal. La distensión abdominal causada por el aire permitirá una mejor una visualización de los órganos genitales (Imagen 3.20D).

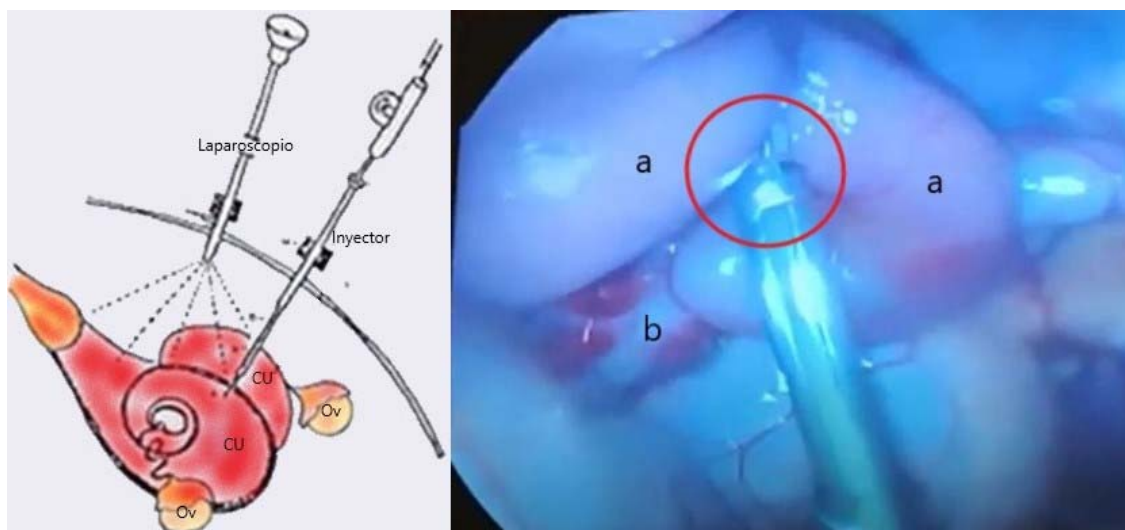
Imagen 3.18



Nota. Área quirúrgica abdominal rasurada donde se realizan la trocarizaciones (círculo rojo) (Gómez, M.V.)

Se introduce el laparoscopio por la cánula, con el objetivo de visualizar los cuernos uterinos (Imagen 3.20E). El útero se localiza en craneal a la vejiga, pudiendo estar debajo debido a la posición del animal. Paso seguido, se realiza la segunda trocarización abdominal (trocar de 5mm) en el lado opuesto a la primera. Un auxiliar debe preparar el inyector de inseminación momentos antes de la segunda trocarización, luego de la cual, se retira el trócar y se introduce el inyector de inseminación, el que se puede utilizar para reubicar el útero en el campo visual de ser necesario (Imagen 3.20F). Si el operador es diestro es recomendable que utilice el laparoscopio con su mano izquierda y con la mano derecha el inyector, y a la inversa si es zurdo. Una vez localizado el sitio de inseminación, entre el tercio anterior y medio de la curvatura mayor del útero, se exterioriza la aguja del inyector y se perfora la pared uterina en forma perpendicular a la pared, hasta llegar a la luz de dicho órgano (Imagen 3.19 A y B; 3.20F). Se realiza la descarga de la mitad de la dosis correspondiente y se repite la operación en el otro cuerno uterino.

Imagen 3.19



Nota. A) Representación esquemática del sitio de inseminación artificial vía laparoscópica (Adaptado de Fernández Abella) B) Imagen laparoscópica del sitio de inseminación (círculo rojo) en el cuerno uterino. (a) Cuernos uterinos (b) Ovario. (Gómez, M.V.).

Se retira el instrumental, teniendo en cuenta de que antes de quitar la cánula de 10mm se libera el aire de la cavidad abdominal y se realiza la limpieza con antiséptico del abdomen y la aplicación de un antiparasitario externo que evite la formación de larvas de moscas (Imagen 3.20H). De ser necesario puede realizarse un punto de sutura en piel y aplicarse antibiótico por vía intramuscular. La hembra debe permanecer en un lugar tranquilo por un tiempo aproximado de una hora luego de la laparoscopia.

Al finalizar la IA se deben registrar las observaciones o complicaciones presentadas durante la realización de la IA y se deberá procurar que las hembras queden alojadas en un lugar tranquilo y al reparo durante al menos dos horas post-IA.

Procedimiento para descongelar pajuelas de semen

Las pajuelas de semen se encuentran conservadas en un termo de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C . Para retirar las mismas debemos elevar el canastillo hasta la boca del termo y se retira individualmente con una pinza larga preenfriada. Se recomienda el uso de guantes gruesos y antiparras para realizar esta maniobra por posibles salpicaduras de nitrógeno líquido. Una vez retirada la pajuela se la coloca en baño María a una temperatura de 37°C durante 30 segundos. Se la retira del baño María y se la seca con papel absorbente y se corta la pajuela por el extremo donde se encuentra sellada, generalmente un tapón de alcoholpolivinílico, en forma perpendicular. Se coloca la pajuela dentro de la pistola de inseminación y se cubre el conjunto con la vaina correspondiente y se ajusta posteriormente con la arandela. Por último, se empuja suavemente el émbolo hasta que aparezca una pequeña gota por el extremo inseminante de la pistola.

Se recomienda, previo al proceso de inseminación, que se evalúe microscópicamente las dosis seminales. Las pajuelas descongeladas deben reunir ciertos requisitos mínimos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2

Valores mínimos aceptables al descongelamiento de la pajuela de 0,25ml

Parámetro	Valor mínimo aceptable
Dosis inseminante	20 (10-50) $\times 10^6$ espermatozoides/pajuela
% espermatozoides vivos	40-60%
Motilidad individual	$\geq 50\%$
Vigor	≥ 3

Imagen 3.20

Secuencia del procedimiento de inseminación laparoscópica



Nota. A) Preparación del instrumental B) Preparación del animal C) Trocarización D) Insuflando de la cavidad abdominal E) Introducción del laparoscopio F) Preparación del material a inseminar G) Inseminación de la oveja H) Desinfección de la zona quirúrgica (Seillant, C.A.)

Resultados del proceso de inseminación

Los resultados que se obtienen mediante el proceso de IA son variables (Tabla 3.3). Como se ha desarrollado anteriormente, estos resultados son dependientes del protocolo de sincronización de celos utilizado, si la IA se realizó a celo detectado o a tiempo fijo, la vía y técnica de inseminación, el tipo de conservación del semen, factores inherentes a la especie y a la raza o craza, sin dejar de considerar factores humanos y aquellos que influyen sobre éste, así como factores ambientales y propios del establecimiento (manejo, instalaciones, entre otros).

Debido a la multiplicidad de los factores que influyen sobre la resultante del proceso de IA, el resultado nunca será mayor al menor de sus factores. A modo de ejemplificar tomaremos 4 factores: el protocolo sincronización (A), el semen (B), el inseminador (C) y la condición de las hembras (D). Le asignaremos un valor y la multiplicación de estos factores nos dará una potencial resultante del proceso de IA

$$A \times B \times C \times D = \text{resultante del proceso de IA}$$

A cada factor le asignamos un valor, por ejemplo:

$$90\% \times 90\% \times 90\% \times 80\% = 58,3\%$$

Observamos que partiendo de valores muy buenos podríamos esperar alrededor de 60% de gestación.

Ahora bien, supongamos que el semen congelado fue mal conservado y las restantes condiciones se mantienen constantes:

$$A \times B \times C \times D = \text{resultante del proceso de IA}$$

$$90\% \times 10\% \times 90\% \times 80\% = 6,48\%$$

El resultado a esperar sería de 6,5% de gestación.

Otra situación sería que el inseminador no tuviese la suficiente experiencia y le asignamos un valor del 65% de eficiencia mientras que los demás factores se mantienen como en el primer ejemplo, el resultado sería:

$$90\% \times 90\% \times 65\% \times 80\% = 42,1\%$$

El resultado a esperar sería de 42% de gestación.

También, debemos prestar atención de qué manera fueron expresados los resultados de la inseminación, ya que en ocasiones los resultados no fueron expresados en % de preñez si no en % de parición. Además, también debemos considerar cuándo y con qué método se realizó el diagnóstico de gestación ya que en la medida que se realice con posterioridad a los 30 días de la inseminación cabe la posibilidad de que los resultados sean menores por la factibilidad de abortos.

Tabla 3.3*Porcentaje de preñez en relación a la vía de IA y la conservación de semen*

Técnica de IA	Vía de IA	Conservación semen	% de preñez
Vaginal profunda	Vaginal	Fresco/refrigerado	40-50%
		Congelado-descongelado	10-15%
Cervical	Cervical	Fresco/refrigerado	40-65%
		Congelado-descongelado	10-30%
Intrauterina transcervical	Cervical (Método de Guelph)	Fresco/refrigerado	60-80%
		Congelado-descongelado	40-70%
Intrauterina laparoscópica	Laparoscopia	Fresco/refrigerado	70-90%
		Congelado-descongelado	50-80%

Bibliografía

- Alvarez M, Anel-Lopez L, Boixo JC, Chamorro C, Neila-Montero M, Montes-Garrido R, de Paz P, & Anel, L. (2019). Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S4), 32-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.13523>.
- Anel L, Kaabi M, Abroug B, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, de la Fuente LF, de Paz P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 2005; 63(4):1235-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.001
- Bottaro M, Fossatti Leániz F, Gil J, Martincorena M A, Olivera J, & Regusci M. (2008). ¿Cuál es el momento óptimo de IATF con semen fresco en ovinos sincronizados con prostaglandinas? XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría.
- Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalira A, Menchaca A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 2017; 103:30-35. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.021
- de Figueredo Freitas VJ, Rubianes E. Capítulo 7: Preparación de las hembras. Detección y control del estro y la ovulación. In: *Reproducción Ovina y Caprina*. 2004. Ed. Aisen E. Inter-médica Editorial. Buenos Aires, Argentina.
- Donovan A, Hanrahan J P, Kummen E, Duffy P, & Boland M P. (2004). Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, 84(3-4), 359-368.

- <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.014>
- Eppleston J, Maxwell WM. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology*. 1995; 43(4):777-88. doi: 10.1016/0093-691x(95)00020-9
- Evans G, Maxell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1990. Editorial Acribia. España.
- Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, Donovan A, Boland MP, Lonergan P, Evans AC. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*. 2005 15; 63(7):1995-2005. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.005
- Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Soto AT, de la Sota RL, Cueto MI, Lacau-Mengido IM, Gibbons AE. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. *Theriogenology*. 2019; 126:63-67. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.008.
- Fernandez-Abella D, Preve MO, Villegas N. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*. 2003; 60(1):21-6. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01041-5
- Franco, J. A. Q., Heredia, M., & Rivera, O. L. R. Detección del estro en un rebaño de ovejas pelibue y con utilización de hembras androgenizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1988; 26(1), 1-7.
- Fierro S, Olivera J, Gil J. 2007. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco y refrigerado en ovinos con el protocolo synchrovine. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría.
- Gourley DD, Riese RL. Laparoscopic artificial insemination in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1990 6(3):615-33. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30836-7
- Gómez MV. Evaluación de protocolos de sincronización de celos con progesterona y benzoato de estradiol para inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos. Tesis doctoral – Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata. 2020. <https://doi.org/10.35537/10915/111878>
- Gourley DD, Riese RL. Laparoscopic Artificial Insemination in Sheep. 1990. *Vet. Clin. North Amer.: Food Animal Practice*; 6 (3): 615-633.
- Hiwasa M, Kohno H, Togari T, Okabe K, Fukui Y Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod Dev*. 2009 Feb; 55(1):50-4. doi: 10.1262/jrd.20062.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*. 2005; 64(5):1225-35. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.017
- Kumar D, Naqvi SM. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. *J Anim Sci Technol*. 2014; 56:8. doi:

10.1186/2055-0391-56-8.

- Macías A, Ferrer LM, Ramos JJ, Lidón I, Rebollar R, Lacasta D, Tejedor MT. Technical Note: A new device for cervical insemination of sheep - design and field test. *J Anim Sci.* 2017; 95(12):5263-5269. doi: 10.2527/jas2017.1951
- Martínez Rojero RD, Reyna Santamaría L. Uso de testosterona en hembras caprinas adultas para la inducción de comportamiento de macho para la detección de estros. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 2016; 20(1): 15-22
- Masoudi R, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology.* 2017; 74:77-80. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.11.012.
- McCappin N, Murray RD. Some factors affecting pregnancy rate in ewes following laparoscopic artificial insemination. *Vet Rec.* 2011 29; 168(4):99. doi: 10.1136/vr.c5979
- Palacín I, Yániz JL, Fantova E, Blasco ME, Quintín-Casorrán FJ, Sevilla-Mur E, Santolaria P. Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep. *Anim Reprod Sci.* 2012 Jun; 132(3-4):139-44. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.005
- Paulenz H, Adnøy T, Fossen OH, Söderquist L, Berg KA. Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. *Vet Rec.* 2002 Mar 9; 150(10):299-302. doi: 10.1136/vr.150.10.299
- Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci.* 2010; 118(2-4):231-5. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.06.014
- Robinson JJ, McKelvey WA, King ME, Mitchell SE, Mylne MJ, McEvoy TG, Dingwall WS, Williams LM Traversing the ovine cervix - a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal.* 2011; 5(11):1791-804. doi: 10.1017/S1751731111000978
- Rodríguez Gavancho F, Muscari J, Sacsara R. Características morfológicas del cuello uterino de la oveja Corriedale. *Spermova,* 2015; 5(1): 71-74
- Sathe SR. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants-A Procedure Review. *Front Vet Sci.* 2018 23; 5:266. doi: 10.3389/fvets.2018.00266.
- Seillant, C.A; de la Sota, R.L.; Soto, A.T. Eficiencia de la inseminación artificial por vía laparoscópica en ovejas de núcleo genético bajo condiciones comerciales en la Mesopotamia Argentina durante el período 2004/06. 2007. V Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina.
- Sisson S. Capítulo 31: Sistema urogenital de los rumiantes. In: *Anatomía de los animales domésticos.* Tomo I.1985. Reimpresión. Quinta Edición. Ed. Getty R. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España.
- Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JT, Buckrell BC. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 1994; 42(1):147-57. doi: 10.1016/0093-691x(94)90671-5