

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



INSEMINACIÓN INTRAUTERINA POR MINILAPARATOMIA EN OVINOS DE PELO UTILIZANDO SEMEN CONGELADO.

T E S I S
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

CARLOS ÁNGEL GUTIÉRREZ CARMONA

DIRECTOR DE TESIS

DR. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

OCTUBRE 2011

Inseminación intrauterina por minilaparatomía en ovinos de pelo utilizando semen congelado. Tesis presentada por Carlos Ángel Gutiérrez Carmona como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Victor Manuel Gonzalez Vizcarra
Director de tesis

Dr. Martin Francisco Montaña Gómez
Co-Director

Dr. Jaime salinas Chavira
Asesor

M.C. Olga Maritza Manriquez Núñez
Asesor

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis padres Carlos y Lucia así como a mis hermanos:

Karla.

Diana.

Abraham.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por la vida, por la oportunidad que me da de superarme, además por cada una de las promesas que veo cumplidas al finalizar este trabajo y por multiplicar mis fuerzas cuando estaba cansado.

También a mi Papá, a mi Mamá y a mis hermanas: Karla y Diana y a mi hermano Abraham por sus oraciones y aliento que me motivaron a seguir adelante cuando el camino se veía difícil.

Además agradezco profundamente al Dr. Víctor Manuel González Vizcarra por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo, así como por sus consejos y guía, porque mas que un tutor es un amigo.

Así mismo agradezco a mis amigos, compañeros y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollo una nueva técnica para la inseminación intrauterina en borregas, Se describe la inseminación intrauterina por minilaparatomía en ovinos con semen congelado en pajillas de 0,25 cc. El semen de ovino fue congelado en el otoño, y utilizado en borregas en temporada reproductiva y en anestro. Las borregas utilizadas fueron criollas y cruza en distintas proporciones de raza Kathadin, maduras y en buen estado de salud y condición corporal de 3.5. Fueron sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización de celos, consistente en esponjas vaginales con 60 mg. de medroxiprogesterona por 14 días, y 400 UI de PMSG al retirar la esponja. Fueron inseminadas 48 horas después de retiradas las esponjas, sin detección de celo. Las pajillas fueron descongeladas en baño maría a 37 ° C durante 1 minuto. Se depositó media pajilla en cada cuerno uterino. De un total de 24 borregas inseminadas (12 fueron nulíparas y 12 multíparas) 17 de ellas (70.8%) quedaron preñadas (8 y 9 respectivamente) llevando la gestación a término con algunos partos de mellizos, trillizos, un parto único y otra con cuatrillizos, lo que demuestra la viabilidad del procedimiento de inseminación.

Abstract

The objective of this study was to develop of a new technique for IA in ewes. Intrauterine insemination by minilaparatomy was permormed using frozen semen in straws of 0.25 cc. Sheep's semen was frozen in the winter and used in ewes on reproductive season and anestro. Ewes used in this study were criollas and crosses in different proportions of Kathadin, mature and in good health and with body condition score of 3.5. All ewes were subjected to an induction treatment which included of vaginal sponges with 60 mg. of medroxyprogesterone for 14 days and 400 IU of PMSG injection the last day of treatment, when vaginal sponges were removed. All ewes were inseminated 48 hours after vaginal sponges were removed. Insemination was performed without heat detection. Semen used was unfrozen in warm water at 37 °C during one minute. A small incision in the ventral midline was used for aproach to the uterine. Semen was deposited in each uterine lumen horn

A 24 IA ewes 12 nuliparous and 12 multiparous, 17 of them (70.8 per cent) were pregnant (8 and 9 respectively) and calvin, some with twins, triplet and a single another with cuatrillizos, which demonstrates the viability of the insemination procedure.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS:	1
OBJETIVOS	2
REVISION DE LITERATURA.....	3
Inseminación artificial	3
Técnicas de inseminación artificial	3
Inseminación Vaginal	4
Inseminación Cervical	4
Inseminación Transcervical	5
Inseminación Intrauterina por Laparotomía	5
Inseminación Intrauterina por Laparoscopia	5
Ventajas de la Inseminación Artificial	6
Desventajas de la Inseminación Artificial	6
Equipo Necesario para la Inseminación Artificial	7
Equipo para inseminación artificial vaginal o cervical:.....	7
Equipo para inseminación artificial intrauterina	7
Reconocimiento materno de la preñez	8
Progesterona.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Ubicación y clima	13
Animales	13
Sincronización de estro.....	13
Técnica de inseminación.	15
Recolección de semen.....	19
Evaluación de semen.....	20
Criterios para la aprobación de una muestra	22
Procesamiento del semen	22
RESULTADOS.....	24
CONCLUSIONES	28
LITERATURA CITADA.....	29

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1 Lavado de región vulvar previo a la colocación de esponjas.	13
Figura 2 Abertura de labios vulvares.	14
Figura 3 Introducción aplicador de esponjas.	14
Figura 4 Retiro de las esponjas.	15
Figura 5 Colocación de las borregas para su inseminación.	16
Figura 6 Sitio para realizar la anestesia regional.	16
Figura 7 Incisión delante de la base de la ubre.	17
Figura 8 Cuernos uterinos expuestos al momento de la inyección del semen.	17
Figura 9 Al igual que la figura anterior se muestra el sitio de inyección en el cuerno uterino.	18
Figura 10 Sutura de la pared abdominal, posterior al procedimiento.	18
Figura 11 Aplicación del desinfectante sobre la herida suturada.	19
Figura 12 Oveja en potro de sujeción.	19
Figura 13 Vagina artificial.	20
Figura 14 Colección del semental.	20

Introducción

La inseminación artificial en borregas es una herramienta que nos permite realizar de una manera mas eficiente el manejo reproductivo del hato, sin embargo existe la limitación que en esta especie no se puede llevar a cabo la inseminación artificial por vía transcervical debido a las condiciones anatómicas del cérvix. Las ovejas tienen un cérvix más largo y más complejo que otros rumiantes. El cérvix ovino es aproximadamente de 12 centímetros de longitud y tiene 6 o 7 anillos tortuosos que hacen muy difícil la introducción del instrumental para la inseminación lo que puede resultar muy traumático para la oveja. Hay también un pliegue de tejido situado en la entrada del cérvix que hace que la entrada al primer anillo cervical sea especialmente difícil. Cuando la inseminación artificial se lleva a cabo de esta manera se traduce en tasas de preñez muy bajas que oscilan en un 14.4% (De Nava et al., 2003). Estas bajas tasas de preñez han llevado a la necesidad de desarrollar nuevas técnicas como son la inseminación artificial por laparoscopia y la inseminación artificial por minilaparotomía con cánula abdominal, sin embargo, su uso está limitado debido a los altos costos que implica la técnica por la especialización del equipo, el tiempo que se requiere para llevarla a cabo además de las condiciones especiales de infraestructura requeridas. Por estas limitaciones se propone el uso de una nueva técnica de inseminación artificial por minilaparotomía simple e inyección seminal en útero.

Hipotesis

La técnica de inseminación por minilaparatomía y punción uterina es igual o mejor en cuanto al número de gestaciones obtenidas con otras técnicas ya existentes.

Objetivos

Demostrar la efectividad de la inseminación artificial por minilaparatomía frente a la técnica tradicional de laparoscopia ya comprobada y usada solo en los sectores económicos más favorecidos, y que no está al alcance de los pequeños productores por su precio y por los riesgos (perforaciones) que genera el manejo de personal no experto.

Incentivar la aplicación de la inseminación artificial con el fin de, en un menor tiempo, mejorar el índice de prolificidad ovina y con ello aumentar la eficacia y la eficiencia reproductiva dentro de los rebaños.

Revisión de Literatura

Inseminación artificial

La inseminación artificial también llamada instrumental, es la técnica mediante la cual, a través de instrumentos, se introduce y deposita semen vivo dentro el aparato reproductivo de la hembra en celo, con el fin de lograr la preñez. Maxwell, (1986).

Técnicas de inseminación artificial

El objetivo de la técnica de inseminación es colocar el semen en la parte del aparato reproductor de la hembra, en donde ofrezca mejores posibilidades de concepción. La técnica de la inseminación artificial es diferente en cada una de las especies domésticas. Esto se debe en parte al tamaño de las hembras, pero también a la anatomía de su aparato reproductor. Debido al tamaño de la oveja, es necesario utilizar el método vaginal o cervical descrito para la vaca. Por lo general se utiliza una lámpara de cabeza, se inserta el instrumento inseminador en la boca del cérvix, en donde se deposita el semen. (Bearden, J.Fuquay, 2000).

La inseminación en la oveja puede ser vaginal, cervical o intrauterina. Los métodos difieren en cuanto a su complejidad y expectativas de éxito. La inseminación cervical es la técnica más simple y mas rápida cuando se utiliza semen fresco diluido, pero requiere una dosis que generalmente es mayor a la que se utiliza en algún otro método. Aunque no se pueda recomendar de una forma general, la inseminación vaginal puede ser útil cuando el tiempo y la disponibilidad sean factores limitantes o para inseminar hembras vírgenes en las que la estrechez de la parte vestibular no permite la penetración del espejulo (Salamón,1990).

Las ovejas son inseminadas durante la primera mitad del periodo de celo, es decir 8 a 14 horas después del comienzo del estro. Se deposita una dosis de 50 a 150 x 10⁶ espermatozoides en 0.05 a 0.1 ml de semen diluido, en la parte posterior del cuello uterino por medio de un espejulo vaginal. La oveja debe de

inmovilizarse en un armazón, colocada sobre el abdomen, o se le fija en una carretilla (MacDonald, 1983).

Inseminación Vaginal

La inseminación vaginal consiste en la deposición del semen fresco diluido, dentro de la parte anterior de la vagina sin el uso del espéculo ni el intento de localizar el cérvix. Con frecuencia se hace referencia a esta técnica como disparo en la oscuridad (DELO o método SID, shot in the dark por sus siglas en inglés) Precisamente por los malos resultados obtenidos, esta técnica fue reemplazada por la cervical y solo se utiliza cuando la segunda es imposible de realizarse. La vulva de la hembra se debe limpiar con un poco de algodón para evitar la contaminación de la vagina al introducir la pipeta, esta se carga primero con un poco de aire, hasta la división 0.2 ml, y luego se sustrae la dosis requerida de semen, obtenida del tubo que se mantiene en baño maria a 30 °C. El aire tiene la misión de ayudar a que se expulse toda la cantidad de semen contenida en la jeringa. (Del Pino 1996).

Inseminación Cervical

A la fecha es la práctica más comúnmente utilizada. La deposición del semen se realiza dentro de los primeros pliegues cervicales, los cuales son visibles con la ayuda de un espéculo con fuente de luz. El método, barato y relativamente fácil, regularmente utiliza semen fresco el cual puede o no ser refrigerado. La utilización de semen congelado ha resultado en rangos poco aceptables de fertilización, pudiendo ser de hasta 10-30% en ovejas. El uso del semen congelado resulta en mayores tasas de concepciones (hasta 70%). Lo anterior probablemente refleja la diferencia en la profundidad de inseminación alcanzada en ambas especies (Chemineau *et al.*, 1991).

Durante el procedimiento de inseminación, se recomienda que las valvas del espéculo no deben permanecer abiertas mucho tiempo para evitar que molesten al animal. Si se hace difícil la colocación del cérvix, es aconsejable

mover la postura de sujeción del animal (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

Inseminación Transcervical

Un método de inseminación artificial transcervical, factible de realizarse en la oveja debe incluir un método por superar con los desafíos anatómicos del cérvix sin inducir trauma. El método de incluir oxitócina (OT) el tratamiento indujo la dilatación cervical y disminuyó la dificultad de pasar un catéter a través del cérvix y el útero. A pesar de eso, hay varios factores desconocidos asociados con este tratamiento. Aunque la oxitócina no afectó la proporción de fertilización, los efectos de manipulación cervical o efectos del tratamiento global no se ha evaluado (Stellflug *et al.*, 2001).

Inseminación Intrauterina por Laparotomía

Inicialmente, para depositar el semen directamente en el útero se realizaba una laparotomía media-ventral. Lo anterior hacía que la técnica solo tuviera uso para propósito de investigación. El método se empezó a asociar con bajos índices de recuperación y sobrevivencia de embriones. Para 1982, se empezó a modificar la técnica y a realizarse mediante laparoscopia (Maxwell, 1986)

Inseminación Intrauterina por Laparoscopia

La deposición del semen directamente dentro del lumen uterino, evitando la barrera natural del cérvix, ha mejorado de una forma radical la fertilidad. La metodología para realizarse es la siguiente: se les suprime el agua y alimento por 12-16 horas, antes de practicar la operación, esta medida reduce el contenido de la vejiga y el rúmen, lo que da por resultado una más fácil localización del útero y evita asimismo, la regurgitación del contenido ruminal durante la laparoscopia, se rasura y esteriliza la piel del área anterior de la ubre, se anestesia localmente en un espacio de 5-7 cm. delante de la ubre y 3-4 cm. de cada lado de esa línea (Killen y Moore, 1970).

Ventajas de la Inseminación Artificial

- Mejora genética.
- Fácil transporte de material genético.
- Aumento de eficacia reproductora.
- Reducción o eliminación de sementales en la ganadería.

Los pequeños ganaderos no precisan mantener sementales en sus explotaciones siempre que puedan obtener el semen de otros lugares. El costo y los inconvenientes de mantener los sementales quedan eliminados. Por otro lado, existen razones de tipo estético ya que en los rebaños de cabras no es necesario mantener a los machos malolientes, sobre todo en aquellos rebaños que estén próximos a zonas urbanas (Ishwar y Momon, 1996).

- Prevención y control de enfermedades
- Utilización de machos incapacitados
- Mantenimiento de registros seguros
- Prevención y control de enfermedades o eliminación de sementales en la ganadería Utilización de machos incapacitados
- Mantenimiento de registros seguros (Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

Desventajas de la Inseminación Artificial

- Reproducción insegura.
- Fertilidad reducida.
- Costos altos

Como con cualquier otra tecnología, han de tenerse en cuenta los costos a la hora de utilizar la inseminación artificial. Entre los costos se incluyen el empleo de los técnicos, equipo, fármacos y hormonas, registros y la compra de semen o selección y mantenimiento de sementales (Salamón, 1990).

Equipo Necesario para la Inseminación Artificial

Equipo para inseminación artificial vaginal o cervical:

El equipo utilizado para la inseminación vaginal esta formado simplemente por una pipeta de plástico rígido conectada a una jeringa de 1,0 ml. Es similar, en todos sus aspectos, al utilizado en inseminación cervical. Excepto que la punta es rígida (Salamón, 1990;).

El equipo básico para la inseminación cervical consiste de una lámpara de cabeza, un espéculo y una pipeta. El espéculo tipo pico de pato es preferible al tipo tubular ya que permite una mejor visibilidad y localización del cérvix, además de que es más fácil de limpiar (por dentro y por fuera). Algunos especulos llevan lámpara incorporada, sin embargo, es más práctico utilizar una lámpara que se coloca en la cabeza del técnico y que lleva una batería de 6 voltios (Bearden y Fuquay, 1982).

Para la inseminación cervical se utilizan varios tipos de pipetas o pistolas de inseminación, pero las más populares son las pipetas de un solo uso, de plástico, que están fabricadas con plástico robusto interno de 2,5 mm, mientras que el extremo es de 5,5 mm, para utilizar en ovejas. La punta de 1 cm. esta ligeramente doblada en un ángulo de 30°; estas pipetas también se pueden utilizar en la cabra, aunque la penetración en cérvix suele ser más fácil si no están dobladas por la punta. El extremo opuesto se conecta a una jeringa de 10 ml y cada vez que se accionan solo pueden liberar una dosis (Chemineau *et al.*, 1991).

Equipo para inseminación artificial intrauterina

Esta formado por un telescopio, dos equipos de trocar-cánula, uno para el telescopio con una conducción de gas y llave de dos vías para este y el otro para la pipeta de inseminación 5 mm con la válvula del gas quitada; una fuente de luz y cable de fibra óptica; una bomba de gas (dióxido de carbono o aire) con regulador y una línea de conducción de ese gas (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990).

Las pipetas de inseminación pueden ser de vidrio o de plástico. Tienen un diámetro interno de 2 mm, el externo es de 4,5 mm y tienen unos 30 cm. de longitud. Si se utilizan pipetas de vidrio deben tener un diámetro externo de 0,04 mm en la parte superior para permitir la aspiración y expulsión de semen. (Bearden y Fuquay, 1982).

Cuadro 1 Volúmenes recomendados para inseminación.

Técnica	Volumen
Para inseminación vaginal	0.30-0.50 ml
Para inseminación cervical	0.05-0.10 ml
Para inseminación intrauterina (Por cada cuerno)	0.05-0.10 ml

Salamón 1990.

Reconocimiento materno de la preñez

Cuando un animal esta preñado, el embrión debe enviar una señal de su presencia para que sea establecida la preñez y mantener la función del cuerpo lúteo, este proceso es conocido como reconocimiento materno de la preñez. La señal enviada por el embrión que mantiene la función del cuerpo lúteo, previniendo el mecanismo luteolítico, es realizada por una proteína llamada interferón τ (Bowen y Burghardt, 2000).

El establecimiento y mantenimiento de la preñez resulta de la señalización por el embrión y requiere la producción de progesterona por el cuerpo lúteo. En la mayoría de los mamíferos, las hormonas producidas por el trofoblasto mantienen directa o indirectamente la producción de progesterona para mantener el cuerpo lúteo. En los animales domésticos, las hormonas del trofoblasto son

antiluteolíticas ya que actúan en el endometrio para prevenir la secreción de PGF2 α . En ovejas gestantes y cilclando, la progesterona autorregula la expresión de los genes para receptores de progesterona en el lumen endometrial y en el epitelio glandular superficial (Spencer y Bazer, 2004).

Mann y Lamming (2001) mostraron que el reconocimiento materno de la preñez exitoso en vacas depende de la presencia de un embrión el cual este bien desarrollado y secretando cantidades suficientes de interferón τ el cual es dependiente de la secreción maternal de progesterona.

Aproximadamente la mitad del material genético de todos los fetos mamíferos son paternalmente heredados, esto se traduce en que el feto expresará antígenos a los cuales el sistema inmune materno no ha sido expuesto, como resultado de estos genes “semi-foráneos” el feto está en riesgo potencial de ser rechazado por el sistema inmune materno, en la misma manera en la cual un órgano transplantado podría ser rechazado (Bainbridge et al., 2001).

Durante el inicio de la preñez, otras sustancias aparte del interferón τ pueden ayudar al mantenimiento del cuerpo lúteo. La prostaglandina E2 (PGE2), producida por el endometrio uterino es un estimulante de cAMP y un potente vasodilatador, ambos poseen efectos opuestos a la PGF2 α (McCracken et al., 1999).

La pérdida embrionaria recurrente espontánea ha sido relacionada con el alto grado de inmunidad maternal durante la preñez. En rumiantes, la adhesión del corion fetal a las carunculas, para formar una placenta epiteliocorial no inicia sino hasta el día 19 de la preñez. Esto debe ser precedido de la señal para el reconocimiento materno de la preñez para prevenir la luteólisis; en vacas esta señal consiste en la producción de interferón τ por el trofoblasto desde el día 10 hasta el día 25 de preñez, además de inhibir la síntesis de receptores para la oxitocina en útero. La implantación exitosa en vacas, requiere una adecuada señal de reconocimiento materno de preñez y la supresión de una respuesta inmune maternal hostil, una falla en alguno de estos procesos podría resultar en

pérdida temprana del embrión. El interferón τ es la mayor señal producida por el trofoblasto durante el periodo de preimplantación. Una inadecuada secreción de interferon τ puede ser relacionada con una preñez fallida y la incapacidad del embrión para prevenir la luteolisis (Leung et al., 2000).

El reconocimiento materno de la preñez en rumiantes requiere la producción de interferones para la implantación del blastocito. Los efectos antiluteolíticos del interferón τ son responsables del reconocimiento materno de la preñez, el cual es el término usado para describir, como una madre responde (fisiológicamente) a la presencia del embrión. En rumiantes domésticos el embrión en desarrollo no se implanta hasta relativamente tarde. A pesar de esto el embrión es capaz de comunicarse bien con la madre antes de que la implantación ocurra y antes de que el embrión tenga acceso a la circulación maternal, una falla del embrión para señalar su presencia en el tiempo apropiado lleva a una pérdida de preñez. Además la concentración plasmática de progesterona maternal, la cual controla la secreción uterina glandular, esta correlacionada con la producción de interferón τ por el embrión, en el ganado, esto sugiere que el interferón τ afecta los receptores de oxitocina a través de una acción inhibitoria de los receptores de estrógenos (Demmers et al., 2001).

En las especies bovinas, del 25 al 40% de todos los embriones, se pierden durante el primer mes de gestación, durante este periodo, dramáticas transformaciones celulares ocurren en el epitelio del útero materno y del embrión, y son acompañadas de una interconexión materno-fetal transitoria apoyada por potentes moléculas asegurando la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo del embrión. La mas importante de estas moléculas probablemente sea el interferón τ , la señal de reconocimiento de preñez, el cual es producido por el embrión bovino entre los días 12 a 28 de preñez, alcanzando sus niveles máximos entre los días 15 a 19 de preñez. De hecho el IFN τ inhibe la expresión de receptores estrógenos en el epitelio uterino de la oveja, previniendo la regulación de receptores de oxitocina por estradiol y la subsiguiente liberación de PGF2 α . En el útero ovino los receptores para los interferones del tipo 1 están expresados

principalmente en el epitelio luminal y glándulas superficiales además del estroma caruncular (Emond et al., 2004).

Progesterona

Durante la preñez, la progesterona tiene un papel importante en la preparación uterina para la recepción del embrión y el mantenimiento de la preñez. Los efectos de la progesterona son mediados por interacciones de esta hormona con sus receptores específicos. La ausencia de receptores para progesterona están asociados con liberación uterina de PGF 2α que conduce a una luteólisis (Sukjumlong et al., 2005)

Durante el diestro, los niveles de progesterona se incrementan y actúan por la vía receptores progesterona para bloquear la expresión de receptores de estrógenos y receptores de oxitocina en el lumen endometrial y epitelio glandular superficial (Spencer et al., 2004).

Como en la mayoría de las especies de mamíferos, la placenta bovina produce progesterona, la cual contribuye solamente a mantener los niveles marginales plasmáticos y su capacidad para mantener la preñez en la ausencia de progesterona lútea está restringida a un período corto de tiempo. La función de la progesterona durante la preñez, no está restringida a la inhibición de las contracciones uterinas y a mantener cerrado el cérvix, sino que algunas funciones relacionadas con la progesterona pueden ser también: protección de la placenta previniendo un ataque inmunológico materno, mantenimiento de la integridad histológica de la parte materna de la placenta. En bovinos, las concentraciones de progesterona en tejidos placentales se incrementan considerablemente en el quinto y sexto mes de gestación, alcanzando sus valores máximos en los cotiledones (aproximadamente 50 ng/g de tejido) en el octavo y noveno mes de gestación (Schuler et al., 1999).

La progesterona facilita el establecimiento de la preñez suprimiendo la expresión de los receptores de oxitocina. Una alta concentración de progesterona

juega un papel esencial en el mantenimiento de la preñez, incluyendo la estimulación de las secreciones uterinas, actuando como un inmunosupresor e inhibiendo las contracciones uterinas (Leung et al., 1998 y Johnson et al., 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y clima

Este experimento fué conducido durante los meses de marzo a septiembre del año 2008, con temperaturas que oscilan entre los 5 °c min. y 30 °c máx. y precipitación pluvial promedio de 0.775 cm, (Centro de clima UABC) en la posta de ovinos del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicada en el kilómetro 3.5 en el margen derecho de la carretera Mexicali – San Felipe, en domicilio conocido del fraccionamiento campestre de la ciudad de Mexicali Baja California.

Animales

Para el experimento se utilizaron 25 borregas, cruzas en distintas proporciones de razas de pelo, asignadas a dos grupos (B1) fueron 11 borregas de segundo a tercer parto y el grupo (B2), n=14, de borregas nulíparas, con pesos promedios de B1= 34kg y B2= 31.19kg de peso vivo,

Sincronización de estro.

Para la sincronización de estros, a los animales agrupados en B1 y B2 les fué colocada una esponja intravaginal (Chronogest®, Intervet) impregnada con progesterona (20 mg de cronolone). Previamente a la colocación de la esponja, la región perineal de los animales fue lavada con agua y jabón quirúrgico (Dermoclean ®) y secada con toallas de papel desechables.



Figura 1 Lavado de región vulvar previo a la colocación de esponjas.

Los labios vulvares fueron separados por un operador provisto de guantes de látex desechables (Ambiderm®), los cuales fueron removidos y desechados después de manipular a cada animal. A través de la abertura vulvar se introdujo un aplicador de esponjas (diseñado expresamente para este proyecto por los autores).



Figura 2 Abertura de labios vulvares.



Figura 3 Introducción aplicador de esponjas.

Se introdujo gradualmente hasta alcanzar el fondo vaginal, teniendo cuidado de no romper el hilo que se mantiene unido en la parte posterior de la esponja. Una vez realizada esta acción, se procedió a sacar el aplicador, dejando en el fondo vaginal a la esponja, el hilo que queda fuera de la abertura vulvar fue recortado de manera tal que solo se exhibía una parte de aprox. 2 cm. fuera de la vulva.

Los pesarios vaginales permanecieron en la vagina por 14 días, tras los cuales fueron retirados, para esto se requirió traccionar hacia fuera de la cavidad vaginal la esponja, sujetando con pinzas hemostáticas el hilo que se dejó colgando fuera de la abertura vulvar. Al tiempo de retirar la esponja se administraron 300 unidades internacionales (u.i) de gonadotropina serica de la yegua preñada (PMSG, por sus siglas en ingles), el tiempo total promedio para el retiro de esponjas y administración de PMSG en los dos grupos fue de 2 minutos. Cabe mencionar que se retiró el 100% de las esponjas, es decir, no hubo problemas de esponjas perdidas (caídas).

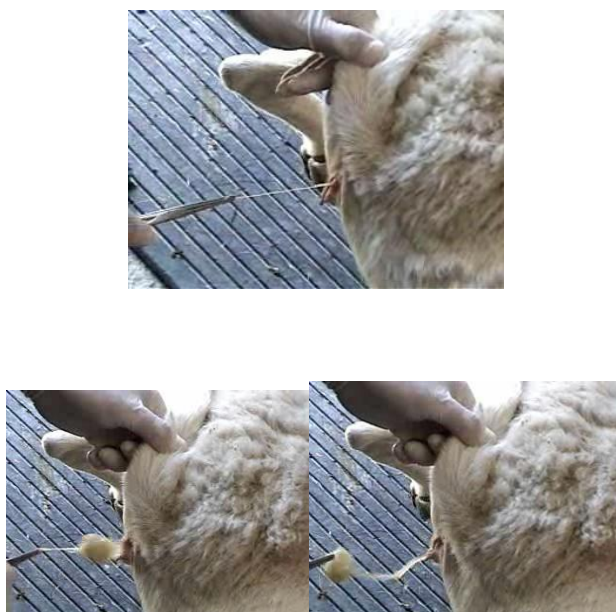


Figura 4 Retiro de las esponjas.

Técnica de inseminación.

Para la técnica de inseminación artificial intrauterina por minilaparatomía, las hembras que presentaron calor o en su defecto a las 48 horas después de haberseles retirado la esponja vaginal y administrárseles PMSG, fueron

conducidas a una área bajo techo y tranquilizadas, para lo cual se utilizó xilazina al 2% (Procim, Brobel ®) a razón de 0.2 mg/kg de peso vivo, administrado vía intramuscular. Lograda la sedación, las hembras se colocaron en decúbito dorsal sobre un cabrestillo donde el animal quedo en una posición inclinada a 45° con el tren posterior mas elevado que la cabeza.



Figura 5 Colocación de las borregas para su inseminación.

La región hipogástrica fue lavada con agua y jabón quirúrgico (Dermoclean ®) y secada con toallas de papel, la zona ubicada por delante de la ubre, la región prepubiana y hasta por detrás de la región umbilical fue embrocada con yodo al 5% en suspensión alcohólica. Posteriormente se aplicó anestesia regional para lo cual se infiltró con xilocaína sin epinefrina al 2% (Pisacaina ®). El sitio se localiza a 5cm por delante de la base de la ubre sobre la línea alba, como se muestra en la figura 6.



Figura 6 Sitio para realizar la anestesia regional.

Posteriormente se dio un masaje permitiendo que el anestésico difundiera a los tejidos; en el sitio anestesiado previamente, se practicó una incisión de 2cm, con bisturí con hojas numero 22 (Sensimedical ®).



Figura 7 Incisión delante de la base de la ubre.

Una vez establecido el canal a la cavidad abdominal se ingresaron unas pinzas de Allis, en busca de los cuernos uterinos, mismos que se encontraron a cada lado y por debajo de la vejiga urinaria, en mayor o menor grado, dependiendo del grado de pletorización de la misma; el cuerno sujeto con la pinza se traccionó y se expuso sobre la línea de incisión.



Figura 8 Cuernos uterinos expuestos al momento de la inyección del semen.

Se localizó la curvatura dorsal del cuerno y se realizó una punción con un instrumento de inseminación diseñado explícitamente para ello, el cual posee una aguja calibre 18G (Exel ®) en un extremo (fabricado solo para este proyecto por los autores) buscando que la trayectoria de la aguja se de en el mismo sentido que el lumen del cuerno uterino.



Figura 9 Al igual que la figura anterior se muestra el sitio de inyección en el cuerno uterino.

En este momento el semen que previamente fué descongelado, se depositó, la mitad de la dosis de la pajilla, en el lumen del cuerno uterino y la acción se repitió de forma similar en el cuerno contrario. Seguidamente los bordes de la herida fueron suturados, para lo cual se utilizó ácido polyglicolico del numero 1 (Atramat ®), colocando un punto en cruz que adose peritoneo y los músculos. La piel fue suturada con el mismo material colocando dos puntos separados con patrón en U, realizado este ultimo paso se aplicó un desinfectante tópico, nitrofurazona (Topazone ®), por una sola ocasión, además de una dosis intramuscular de penicilina con estreptomocina, a razón de 20,000 UI por kg de peso vivo. El tiempo total promedio para la inseminación de los 2 grupos fue de 9.38 minutos. Después de realizado este procedimiento los animales fueron regresados a su corral comunal y se les proporcionó agua y forraje ad libitum.



Figura 10 Sutura de la pared abdominal, posterior al procedimiento.



Figura 11 Aplicación del desinfectante sobre la herida suturada.

Transcurridos 16 días post-inseminación se inició el monitoreo de calores por medio de inspección visual. Los animales se observaron dos horas en la mañana al salir el sol y dos horas en la tarde, (aproximadamente una hora antes de la puesta y una hora después del ocaso). Durante la observación se ingresó un semental con cada grupo de hembras durante dos días, el día 18 se monitorearon desde la salida del sol hasta después del ocaso en intervalos de 2 horas, en los cuales se ingresaron 2 sementales a cada grupo durante dos horas. Después de este tiempo, se retiraron los sementales 2 horas y así sucesivamente hasta después del ocaso, durante la noche se apartaron los sementales de las hembras hasta la mañana. A partir del día 19 hasta el día 22 post-inseminación, se ingresaron dos sementales con cada grupo de hembras desde la salida del sol hasta el ocaso, siendo en este periodo que dos hembras del grupo uno, fueron receptivas a los sementales a los cuales se les permitió realizar la monta natural, el día 22 se concluyó el periodo de observación de calores post inseminación.

Recolección de semen.

Para esto los sementales pasaron por un periodo de entrenamiento previo de dos semanas, durante las cuales se intentó o realizó la recolección de un eyaculado dos veces por semana usando como estímulo una oveja colocada en un potro de sujeción.



Figura 12 Oveja en potro de sujeción.

El semen se recolectó con una vagina artificial. Durante el estudio, el semen se recolectó por las mañanas, dos veces a cada animal por día, con periodos de descanso de dos días.



Figura 13 Vagina artificial.



Figura 14 Colección del semental.

Evaluación de semen.

Una vez obtenida la muestra se llevó al laboratorio y se mantuvo en un baño María (37° c) durante su evaluación, la cual se efectuó de la manera siguiente (Galina *et al.*, 1995)

Volumen. Se determinó por la observación directa del tubo colector graduado inmediatamente después de recolectar la muestra.

Color y olor. Se efectuó por apreciación visual y olfativa del eyaculado inmediatamente después de recolectar la muestra.

Motilidad masal. La evaluación se realizó por la observación al microscopio (100x) de una gota de semen puro sobre un portaobjetos, el cual se

encontraba encima de una plancha térmica con una temperatura de 37° C. La motilidad se determinó observando la intensidad y velocidad de los remolinos que se formaron. La escala de calificación que se usó es de 0 a 5 (Evans y Maxwell, 1990).

Motilidad individual. Para realizar esta evaluación se tomó una gota de semen y se diluyó en una gota de solución de citrato de sodio al 3% previamente atemperado en el baño María, y se colocó entre el portaobjetos y el cubreobjetos, los cuales se encontraban sobre una plancha térmica a 37° C. Una vez colocada la gota se observó a través del microscopio óptico (400x). Se estimó el porcentaje de los espermatozoides que presentaban un movimiento rectilíneo progresivo, y la escala de calificación que se utilizó fue de 0 a 100%.

Concentración. La cuantificación de espermatozoides por mililitro de semen se realizó con una cámara de Neubauer. Primero se realizó, con una micropipeta, una dilución del semen 1:400 en solución salina fisiológica; con ayuda de una pipeta Pasteur, se tomó una gota de esta dilución y se colocó en cada sección de la cámara de Neubauer. Cada una de las dos secciones de la cámara posee una rejilla formada de cinco cuadros por lado (un total de 25 cuadros), cada uno de los cuales, a su vez, está dividido en 16 cuadros más pequeños. Se contaron los espermatozoides que se encontraban en los 4 cuadros de las esquinas y en el cuadro central de la rejilla de 25 cuadros. Los espermatozoides que se hallaban sobre los bordes derecho e inferior de cada cuadro no se contabilizaron. Para el cálculo de la concentración de espermatozoides en el semen evaluado se contaron las dos secciones de la cámara de Neubauer y se obtuvo un promedio de las dos; este número se multiplicó por 20000 (considerando el volumen, la superficie y profundidad de la cuadrícula), lo que daba el número de espermatozoides en 1mm^3 . Este valor se multiplicó por 1000 para obtener la concentración por mL y luego por el volumen obtenido para tener el número de espermatozoides por eyaculado (Evans y Maxwell, 1990).

Criterios para la aprobación de una muestra

Una muestra se consideró como apta para su procesamiento cuando cumplió con los siguientes criterios: color blanco lechoso, volumen de 0.5 a 2.0 ml, concentración espermática superior a 2×10^9 espermatozoides por ml, motilidad espermática mínima de 70%, y un 80% de espermatozoides morfológicamente normales.

Procesamiento del semen

El semen se procesó con Triladyl (Minitüb, Germany; lincomicina y estreptomicina). La preparación del diluyente Triladyl se realizó con 20% de éste, 20% de yema de huevo y 60% de agua tridestilada; primero se mezcló la yema de huevo con el agua tridestilada, hasta que tuviera un aspecto homogéneo, y posteriormente se agregó el diluyente comercial y se mezclaron hasta homogeneizar de nuevo.

Dilución. Se realizó primeramente la predilución de las muestras de semen aptas para procesamiento. Esta predilución consistió en adicionar al semen un volumen igual de diluyente Triladyl (dilución 1:1) y se mantuvo en baño María. Para saber el volumen total de diluyente necesario, se determinó el número de espermatozoides viables de la muestra. Este se estableció multiplicando el volumen de semen obtenido por la concentración espermática por mililitro por el porcentaje de motilidad. El número de dosis se obtuvo del número de espermatozoides viables dividido por el factor de dilución 100×10^6 (Número de espermatozoides por dosis). Para obtener la cantidad total de diluyente a utilizar, se multiplicó el número de dosis por 0.25 ml (volumen de la dosis), menos el volumen del eyaculado. El resto del diluyente (cantidad total de diluyente – volumen del prediluyente) se añadió tan pronto se calculó el volumen total necesario de diluyente mientras la muestra prediluida se encontraba todavía en el baño María.

Enfriamiento. El semen diluido se trasladó del baño María (37° C) a un recipiente con agua a temperatura ambiente (25-28° C) y se colocó dentro de un refrigerador. El enfriamiento de las muestras de 37° C a 5° C se realizó en un

lapso de 2 horas (Evans y Maxwell, 1990) y luego las muestras se envasaron en pajillas de 0.25 ml.

Congelación. Después del envasado, las pajillas se expusieron en posición horizontal a los vapores de nitrógeno líquido (-75 a -125° C), 5 cm sobre la superficie del nitrógeno por 10 minutos, después de este tiempo se sumergieron dentro del nitrógeno líquido (-196° C). Las pajillas se empacaron en bastones de aluminio previamente identificados con el número del semental y se guardaron en el termo de nitrógeno líquido hasta su evaluación.

Descongelación. La descongelación de las pajillas se efectuó a 37° C durante 30 segundos (Aké-López y Sánchez-Encalada, 1997).

RESULTADOS

Pese a que no se realizó detección de celo, todas las borregas mostraron signos evidentes de estar en estro. Los signos eran útero turgente y bien irrigado.

Fueron inseminadas 24 borregas, de ellas 17 (70.8%) quedaron preñadas y parieron 38 crías viables, prolificidad general de 2.23 y de 2.0 y 2.5 para nulíparas y múltiparas respectivamente y pesos de las camadas independientemente del sexo de las crías de 4.35 y 6.19 kg, ($p=0.001$) en ese mismo orden, la proporción de sexos general fue de 36.8% de hembras y 63.15 % machos. El peso promedio al nacimiento de las hembras fue de 2.3 kg, $EE= 0.1818$, $P =0.39$, y pesos máximos de 3.55 kg y mínimos de 1.39 kg, los machos alcanzaron pesos promedios de 2.39 kg con $EE=0.1247$, $p=0.25$ con valores máximos de 3.75 kg y mínimos de 1.24 kg. De todos los nacimientos murieron ocho, se presentaron un parto único y uno cuádruple (5.8% en ambos casos) algunas de ellas con mellizos (70%) y trillizos (17.6%). El procedimiento resultó ser efectivo ya que se lograron un total de 70 % de pariciones, las hembras inseminadas toleraron muy bien el procedimiento, no se encontró signos de dolor o incomodidad , los animales retornaron al consumo de agua y alimento inmediatamente posterior al procedimiento, durante 72 hr posteriores al procedimiento los animales no mostraron signo alguno de infección en las heridas practicadas y al ser revisadas a los 43 días posteriores al procedimiento durante la maniobra de ultrasonografía, no mostraron evidencias de adherencias y/o tejidos anormales en la zona de incisión.

Para lograr aceptables resultados de preñez, el semen que ha sido congelado y descongelado debe ser depositado en la luz del cuerno uterino. Para ello se puede recurrir a la inseminación quirúrgica (Correa et al., 1994), a la inseminación transcervical (Mareco 1993), ó a la practicada en esta experiencia, la inseminación laparotómica. Con esta última técnica se puede acceder en un par de minutos a la cavidad abdominal, y visualizar perfectamente el aparato reproductor, e incluso chequear ovarios para ver si la borrega ovuló.

Es remarcable el hecho de que algunas borregas inseminadas fuera de temporada reproductiva (noviembre), han parido trillizos, lo que hace el programa más atractivo para el productor. El uso de PMSG al retirar la esponja favorece las ovulaciones múltiples, como muestran Cameron et al. (1991).

Los resultados muestran que es posible inseminar borregas en cualquier momento del año y, en consecuencia, lograr nacimientos y lactancias cuando sea económicamente más conveniente. Este tipo de programas abre la posibilidad de utilizar semen congelado de reproductores de gran calidad que ya hay en el país ó de importar semen congelado del exterior y enriquecer la genética ovina regional.

La permanencia de las esponjas fue de 100%.

1. la tasa de no retorno a ciclo estral fue de 92%, es decir 23 de las 25 borregas no presentaron calor.
2. El día 43 post-inseminación se llevo a cabo el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía confirmando la gestación de las 23 borregas que no regresaron a ciclo estral, lo que se traduce en una tasa de preñez con la técnica de inseminación artificial mediante minilaparotomía del 92% a los 43 días confirmado por ultrasonido.

Análisis de varianza para el peso de la camada de acuerdo con el tipo de madre primerizas o múltiparas.

	FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1		14.367157	14.367157	20.4140	0.001
ERROR		15	10.556824	0.703788		
TOTAL		16	24.92			

C.V. = 16.0677 %

Peso de la camada de acuerdo con el tipo de madre primerizas o multiparas.

Tipo madre.	Rep.	Media
Nulíparas 1	9	4.35
Multipara 2	8	6.19

Estadísticos descriptivos para el peso al nacimiento de hembras y machos sin importar el tipo de madre así como el tipo de parto.

<i>Hembras</i>		<i>Machos</i>	
Media	2.3	Media	2.39
Error estandar	0.181	Error estandar	0.124
Mediana	2.03	Mediana	2.34
Desviacion estandar	0.680	Desviacion estandar	0.611
Varianza	0.463	Varianza	0.373
Minimo	1.39	Minimo	1.24
Maximo	3.55	Maximo	3.75
Sum	32.2	Sum	57.57
Cantidad	14	Cantidad	24
Nivel de confianza(95.0%)	0.39	Nivel de confianza(95.0%)	0.25

<i>Nuliparas</i>				<i>Multiparas</i>			
<i>Hembras</i>		<i>Machos</i>		<i>Hembras</i>		<i>Machos</i>	
Media	2.13	Media	2.19	Media	6	Media	2.59
EE	0.40	EE	0.10	EE	0	EE	0.26
DE	0.80	DE	0.37	DE	6	DE	0.82
Minimo	1.67	Minimo	1.6	Minimo	9	Minimo	1.24
Maximo	3.33	Maximo	2.79	Maximo	5	Maximo	3.75
Sum	8.53	Sum	30.67	Sum	67	Sum	25.9
Total	4	total	14	total	10	total	10

CONCLUSIONES

El diseño del instrumento para realizar la inseminación intrauterina fue confeccionado de manera artesanal. No obstante del ello los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de obtener gestaciones mediante el uso de esta técnica. Se demostró que el uso del instrumento equipado con una aguja para realizar la punción intrauterina no genero lesiones del tracto reproductivo de las hembras.

Observando los resultados obtenidos, se evidencio que el uso de una técnica como la que se presenta debe ser implementada en campo con una muestra representativa de animales, con el fin de corroborar la eficiencia mediada por el numero de gestaciones obtenidas y convertirla en una herramienta valiosa para la reproducción de pequeños rumiantes cuando no se dispone de los recursos monetarios necesarios para adquirir los implementos de inseminación laparoscópica.

LITERATURA CITADA

- Arthur, G. H., Noakes, D. E. y Pearson, H. 1991. Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. 6ª ed. Interamericana McGraw-Hill. España.
- Bainbridge, D.R.J., J.L. Sargent and S.A. Ellis. 2001. Increased Expression of Major Histocompatibility Complex (MCH) Class1 Transplantation Antigens Trophoblast Cells Before Fusion with Maternal Cells. Journal of Reproduction and Fertility. 122: 907-913.
- Bearden, H. J. y J. Fuquay. 1982. Reproducción Animal Aplicada. Manual Moderno. México D. F. pp. 135-250.
- Bowen, J.A. and R.C. Burghardt. 2000. Cellular Mechanisms of Implantation in Domestic Farm Animals. Cell and Developmental Biology. (abstract). 11:93-104.
- Cambell, W. J., Havey, G.T., Mc Donald, F.M. y Sparkman, I.R. 1996. Transcervical Insemination in Sheep: an Anatomical Evaluation. Theriogenology 45: 1535-1544.
- Cameron, A.W 1991. PMSG May Directly Stimulate Ovulation in Female Goats. Anim Reprod. Science 25:233-239.
- Chemineau, P., Cagnie, Y., Guerin, Yorgueur, P. y Vallet, J. C. 1991. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma.
- Correa, J.E. 1994. Fertilization Rate in Sheep Unilaterally Inseminated with Frozen Semen. Small Ruminant Research, 13 99-101.
- Del Pino, R. Inseminación Artificial en Ovinos [en línea]. Oct. 2000. <http://webs.demasiado.com/delpino/iavaginal.html>. [Consulta;20 noviembre, 2007)
- Demmers, K.J., K. Derecka and A. Flint. 2001. Trophoblast Interferon and Pregnancy. Journal of Reproduction and Fertility. 121:41-49.

- De Nava, G., M. Rodriguez, O. Irabuena, L. Fernandez y S. Sterla. 2003. Validacion de Metodos Alternativos de Inseminacion Artificial con Semen Congelado en Lanares. Programa de Servicios Agropecuarios. P. 1-19.
- Emond, V., L.A. Maclaren, S. Kimmins, J.A. Arosh, M.A. Fortier and R.A Lambert. 2004. Expression of Cyclooxygenase-2 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Endometrial Epithelium of the Cow is Up-Regulated during Early Pregnancy and in Response to Intrauterine Infusions of Interferon-t. *Biology of Reproduction*. 70:54-64.
- Foot, R. H. 2002. The History of Artificial Insemination: Selected Notes and Notables. *J. Animal. Sci.*: 1-10.
- Hunter, L.C.Faulkner y M.H. Pineda. 1987. Inseminación Artificial: Reproducción de los Animales de Granja, ed. Acribia, S.A. México. p.288
- Hafez, E.S.E. y Hafez B., 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7ª ed. México, D.F. p.387
- H. Joe Bearden, 1982, Reproducción Animal Aplicada.1982. El Manual Moderno. Mexico,D.F. p.48
- Ishwar, K. A, y Momon, A. M. 1996. Embryo Transfer in Sheep and Goats. A Review. *Small Rumin. Res.* 19:135-45.
- Johnson, G.A., T.E. Spencer, R.C. Burghardt, K.M. Taylor, C.A. Gray and F.W. Bazer. 2000. Progesterone Modulation of Osteopontin Gene Expression in the Ovine Uterus. *Biology of Reproduction*. 62:1315-1321.
- Killen, I.D. and Moore, N.W. 1970. Fertilization and Survival of Fertilized Eggs in the Ewes Following Surgical Insemination at Various Times After the Onset of Oestrus. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23:1279-1287.
- Leung, S.T., K. Derecka, G.E. Mann, A.P.F. Flint and D.C. Wathes. 2000. Uterine Lymphocyte Distribution and Interleukin Expression During Early Pregnancy in Cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119:25-33.
- Leung, S.T., T.S. Reynolds and D.C. Wathes. 1998. Regulation of Oxytocin Receptor in the Placentome Capsule Throughout Pregnancy in the Ewe: the Possible Role of Oestradiol Receptor, Progesterone Receptor and Aromatase. *Journal of Endocrinology*. 158:173-181.

- Mann, G.E. and G.E. Lamming. 2001. Relationship Between Maternal Endocrine Environment, Early Embryo Development and Inhibition of the Luteolytic Mechanism in Cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 121:175-180.
- Maxwell, W. M. C. 1986. Artificial Insemination of Ewes with Frozen-Thawed Semen at a Synchronized Oestrus 1. Effects of Time of Oestrus, Ovulation and Insemination on Fertility. *Animal Reproduction Science* 10: 301-308.
- Mccracken, J.A., E.E. Custer and J.C. Lamsa.1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol. Rev.* 79:263-323.
- Mc Donald, L.E. 1983. *Reproducción y Endocrinología Veterinarias*. Ed. Interamericana. p 466.
- Mejía, G. P. y Hernández, O. G. 1996. "Curso Teórico-Práctico sobre Reproducción Aplicada en Pequeños Rumiantes". Universidad Nacional Autónoma de México. Noviembre. p. 28-43.
- Salamón S. 1990. *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. Ed. Acribia. España, 1-171.
- Shuler, G., C. Wirth, Klisch, C. Pfarrer, R. Leiser and B. Hoffmann. 1999. Immunolocalization of Progesterone Receptors in Bovine Placentomes Throughout Mid and Late Gestation and at Parturition. *Biology of Reproduction*. 61:797-801.
- Speedy, Killen and Moore. 1992. *Laparoscopic Intrauterine Insemination in Progress in Sheep and Goat Research*. CAB International, ed. Department of Plant Sciences, University of Oxford, UK. p.5.
- Spencer, T.E. and F.W. Bazer. 2004. Conceptus Signals for Establishment and Maintenance of Pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 249-63.

- Spencer, T.E., G.A. Johnson, R.C. Burghardt and F.W. Bazer. 2004. Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. *Biology of Reproduction*. 71:2-10.
- Stellflug, J. N., Wulster-Radcliffe, M. C., Hensley, E. L., Cowardin, E. A., Seals, R. C. y Lewis, G. S. 2001. Oxytocin Induced Cervical Dilation and Cervical Manipulation in Sheep. *J. Anim. Sci.* (79): 1-6.
- Sukjumlong, S., A-M. Dalin, L. Sahlin and E. Persson. 2005. Immunohistochemical Studies on the Progesterone Receptor (PR) in the Sow during the Oestrus Cycle and in Inseminated Sows at Oestrus and Early Pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 129:349-359.

ADENDUM

XIX Reunión internacional de producción de carne y leche en climas calidos 2009.

Inseminación Intrauterina por minilaparatomía en ovinos de pelo utilizando semen congelado. Pá 302-305.

¹Gonzalez Vizcarra VM*, Gutierrez Carmona C Á, Montaña Gomez , M F

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Universidad Autónoma de Baja California

Resumen

El objetivo de este trabajo fue desarrollo una nueva técnica para la inseminación intrauterina en borregas, Se describe la inseminación intrauterina por minilaparatomía en ovinos con semen congelado en pajillas de 0,25 cc. El semen ovino fué congelado en el otoño, y utilizado en borregas en temporada reproductiva y en anestro. Las borregas eran criollas y cruza en distintas proporciones de raza Kathadin, maduras y en buen estado de salud y condición corporal de 3.5, fueron sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización de celos, consistente en esponjas vaginales con 60 mg. de medroxiprogesterona por 14 días, y 400 UI de PMSG al retirar la esponja. Fueron inseminadas 48 hs. después de retiradas las esponjas, sin detección de celo. Las pajillas fueron descongeladas en baño maría a 37 ° C durante 1 minuto. Se depositó media pajilla en cada cuerno uterino. De un total de 24 borregas inseminadas, 12 nulíparas y 12 múltiparas, 17 de ellas (70.8%) quedaron preñadas (8 y 9 respectivamente) y parieron, algunas de ellas con mellizos, trillizos, un parto único y otra con cuatrillizos, lo que demuestra la viabilidad del procedimiento de inseminación.

Introducción

La inseminación artificial en borregas es una herramienta que nos permite realizar de una manera mas eficiente el manejo reproductivo del hato, sin embargo existe la limitación de que en esta especie no se puede llevar a cabo la inseminación artificial por vía transcervical debido a las condiciones anatómicas del tracto reproductivo de la hembra. Las ovejas tienen un cervix más largo y más complejo que el de otros rumiantes. Es aproximadamente de 12 centímetros de longitud y tiene 6 o 7 anillos tortuosos que hacen muy difícil la introducción del instrumental para la inseminación y que puede resultar muy traumática para la oveja, hay también un pliegue de tejido situado en la entrada del cervix que hace que la entrada al primer anillo cervical sea especialmente difícil. Cuando la inseminación artificial se lleva a cabo de esta manera se traduce en tasas de preñez muy bajas que oscilan en un 14.4% (De Nava et al., 2003). Estas bajas tasas de preñez han llevado a la necesidad de desarrollar nuevas técnicas como lo son la inseminación artificial por laparoscopia y la inseminación artificial por minilaparotomía con cánula abdominal, sin embargo, su uso esta limitado debido a los altos costos que implica la técnica, por la especialización del equipo, el tiempo que se requiere para llevarla a cabo además de las condiciones especiales de infraestructura requeridas. Por estas limitaciones se propone el

¹ Par comunicación con el autor : VVizcarra@uabc.mx

uso de una nueva técnica de inseminación artificial por minilaparotomía simple e inyección seminal en útero.

Materiales y métodos

Animales: Las borregas eran criollas y cruce en distintas proporciones de raza Kathadin, maduras y en buen estado de salud y condición corporal de 3.5. Propiedad del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California ubicado en el Valle de Mexicali y fueron inseminadas en el mes de abril del año 2008, semen utilizado fué congelado por la Universidad de Yucatán 2007, En este caso se utilizó semen de un reproductor de la raza Dorper blanco.

Tratamientos hormonales : Las borregas fueron sincronizadas con un dispositivo intravaginal, esponja con 60 mg. de medroxiprogesterona (MAP), que se colocó profundamente en el fondo de la vagina y allí permaneció durante 14 días. Cada borrega recibió 400 UI de PMSG vía intramuscular (Novormon, Lab. Syntex) al serle retirada la esponja.

Inseminación : los animales se dietaron 12 horas antes de la inseminación, una vez transcurrido este tiempo se condujeron a un corral de manejo, se sujetan y tranquilizan con xilazina a razón de 0.2mg/kg administrada intramuscularmente, se pasa al animal al cabrestillo o brete de sujeción en posición supino, se depila, se embroca y se realiza la anestesia regional con lidocaína, posteriormente se realiza la incisión 3 cm. por delante de la base de la ubre hasta alcanzar cavidad abdominal, se localizan los cuernos uterinos y se exteriorizan, en este momento se lleva a cabo la punción de los cuernos uterinos y la inyección del semen previamente descongelado, se recoloca el útero en cavidad abdominal, se sutura la pared muscular y piel, se desinfecta el área con desinfectante tópico, se administra una sola dosis de antibiótico y finalmente se regresan los animales a su corral de estar y se les ofrece agua y alimento.

El semen, congelado en pajillas de 0,25 cc, fué descongelado en baño maría a 37 ° C durante 1 minuto. El número de espermatozoides vivos que contenía cada pajilla era de 100 millones antes de la congelación. Antes de ser utilizada, cada pajilla fué chequeada entre portaobjetos y cubreobjetos entibiados a 37 ° C para comprobar la viabilidad y la motilidad de las células espermáticas. Se utilizó una pajilla para cada borrega, descargando media unidad inseminante en cada cuerno uterino.

Resultados y Discusión

Pese a que no se realizó detección de celo, todas las borregas mostraron signos evidentes de estar en estro. Los signos eran útero turgente y bien irrigado. Fueron inseminadas 24 borregas cruces en distintas proporciones de raza katadin , en la posta ovina del instituto de investigaciones en ciencias veterinarias, en el valle de Mexicali Baja California, en abril de 2008, de ellas 17 (70.8%) quedaron preñadas y parieron 38 crías viables, prolificidad general de 2.23 y de 2.0 y 2.5 para nulíparas y multíparas respectivamente y pesos de las camadas independientemente del sexo de las crías de 4.35 y 6.19 kg, ($p=0.001$) en ese mismo orden, la proporción de sexos general fue de 36.8% de hembras y 63.15 % machos. El peso promedio al nacimiento de las hembras fue de 2.3 kg, $EE= 0.1818$, $P =0.39$, y pesos máximos de 3.55 kg y mínimos de 1.39 kg, los machos alcanzaron pesos promedios de 2.39 kg con $EE=0.1247$, $p=0.25$ con valores máximos de

3.75 kg y mínimos de 1.24 kg. De todos los nacimientos murieron ocho, se presentaron un parto único y uno cuádruple (5.8% en ambos casos) algunas de ellas con mellizos (70%) y trillizos (17.6%).El procedimiento resulto ser efectivo ya que se lograron un total de 70 % de pariciones, las hembras inseminadas toleraron muy bien el procedimiento, no se encontró signos de dolor o incomodidad , los animales retornaron al consumo de agua y alimento inmediatamente posterior al procedimiento, durante 72 hr posteriores al procedimiento los animales no mostraron signo alguno de infección en las heridas practicadas y al ser revisadas a los 43 días posteriores al procedimiento durante la maniobra de ultrasonografía, no mostraron evidencias de adherencias y/o tejidos anormales en la zona de incisión.

Para lograr aceptables resultados de preñez, el semen que ha sido congelado y descongelado debe ser depositado en la luz del cuerno uterino. Para ello se puede recurrir a la inseminación quirúrgica (Correa., et al 1994), a la inseminación transcervical (Mareco 1993),ó a la practicada en esta experiencia,la inseminación laparotomica. Con esta última técnica se puede acceder en un par de minutos a la cavidad abdominal,y visualizar perfectamente el aparato reproductor,e incluso chequear ovarios para ver si la borrega ovuló.

Es remarcable el hecho de que algunas borregas inseminadas fuera de temporada reproductiva (noviembre), han parido trillizos, lo que hace el programa más atractivo para el productor. El uso de PMSG al retirar la esponja favorece las ovulaciones múltiples, como muestran Cameron et al (1991).

Los resultados muestran que es posible inseminar borregas en cualquier momento del año y, en consecuencia, lograr nacimientos y lactancias cuando sea económicamente más conveniente. Este tipo de programas abre la posibilidad de utilizar semen congelado de reproductores de gran calidad que ya hay en el país ó de importar semen congelado del exterior y enriquecer la genética ovina regional.

Conclusiones

El diseño del instrumento para realizar la inseminación intrauterina fue confeccionado de manera artesanal. No obstante del ello los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de obtener gestaciones mediante el uso de esta técnica. Se demostró que el uso del instrumento equipado con una aguja para realizar la punción intrauterina no genero lesiones del tracto reproductivo de las hembras.

Observando los resultados obtenidos, se evidencio que el uso de una técnica como la que se presenta debe ser implementada en campo con una muestra representativa de animales, con el fin de corroborar el la eficiencia mediada por el numero de gestaciones obtenidas y convertirla en una herramienta valiosa para la reproducción de pequeños rumiantes cuando no se dispone de los recursos monetarios necesarios para adquirir los implementos de inseminación laparoscópica.

Bibliografía

- De Nava, G., M. Rodriguez, O. Irabuena, L. Fernandez y S. Sterla. 2003. Validacion de Metodos Alternativos de Inseminacion Artificial con Semen Congelado en Lanares. Programa de Servicios Agropecuarios. P. 1-19.
- Cameron, A.W 1991. PMSG May Directly Stimulate Ovulation in Female Goats. Anim Reprod. Science 25:233-239.
- Correa, J.E. 1994. Fertilization Rate in Sheep Unilaterally Inseminated with Frozen Semen. Small Ruminant Research, 13 99-101.
- Mareco,G. 1993. Inseminación Intrauterina Transcervical de Cabras. Vet. Arg. Vol X , nº 97.