

Nº 31
221



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"EL USO DEL LAPAROSCOPIO PARA LA INSEMINACION ARTIFICIAL INTRAUTERINA UTILIZANDO SEMEN CONGELADO EN EL GANADO OVINO

T E S I S

Que Para obtener el Titulo de :
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a
ELIZABETH M. M. BUTT PROBST

ASESORES :

M.V.Z. JAVIER VALENCIA MENDEZ
M.V.Z. ROSA B. ANGULO MEJORADA
MEXICO, D.F. 1992



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | P A G I N A |
|--|-------------|
| 1.0 RESUMEN ----- | 1 |
| 2.0 INTRODUCCION ----- | 2 |
| 3.0 HIPOTESIS ----- | 7 |
| 4.0 OBJETIVO ----- | 7 |
| 5.0 MATERIAL Y METODOS ----- | 8 |
| 5.1 Diseño Experimental ----- | 8 |
| 5.2 Colección y Almacenamiento de Semen - | 8 |
| 5.3 Tratamiento de Borregas y Manejo -- | 9 |
| 5.4 Inseminación Cervical ----- | 9 |
| 5.5 Inseminación Intrauterina ----- | 9 |
| 5.6 Evaluación de los Resultados ----- | 11 |
| 6.0 RESULTADOS ----- | 12 |
| Cuadro #1 ----- | 13 |
| 7.0 DISCUSION ----- | 14 |
| 8.0 CONCLUSION ----- | 19 |
| 9.0 LITERATURA CITADA ----- | 20 |
| 10.0 ANEXOS ----- | 25 |
| Gráfica #1 Niveles de progesterona al día 18 post-inseminación intrauterina ----- | 26 |
| Gráfica #2 Niveles de progesterona al día 18 post-inseminación cervical ----- | 27 |
| Figura #1 Material utilizado para la IA por laparoscopia ----- | 28 |
| Figura #2 Trocar-canula desarmado ----- | 29 |
| Figura #3 Fuente de luz ----- | 29 |
| Figura #4 Cordero Suffolk/Rambouillet- producto de la IA por laparoscopia ----- | 30 |
| Figura #5 Cordero Suffolk/Rambouillet- producto de la IA por laparoscopia ----- | 30 |

1.0 RESUMEN

BUTT PROBST ELIZABETH. El uso del laparoscopio para la inseminación artificial intrauterina utilizando semen congelado en el ganado ovino. (bajo la dirección del M.V.Z. Javier Valencia Mendez y M.V.Z. Rosa Berta Angulo Mejorada).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la técnica de inseminación intrauterina mediante laparoscopia utilizando semen congelado en ovinos, y comparar los resultados con aquellos obtenidos mediante inseminación cervical con semen congelado. El experimento se realizó en la ex-hacienda Zacatepec, en el municipio Domingo Arenas en el estado de Tlaxcala. Se utilizó un total de 32 borregas Rambouillet, las cuales fueron inseminadas con semen congelado procedente de 3 sementales Suffolk del Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R.), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El 50% de las borregas (n=15) se inseminó mediante la laparoscopia directamente en el lumen uterino, y el 50% restante (n=16) se inseminó por vía vaginal en la os externa del cérvix. Cada borrega recibió una sola dosis de semen congelado con un volumen total de 0.25 ml y una concentración de 300×10^6 células espermáticas. La detección de calores se realizó dos veces al día y las borregas fueron inseminadas a las 12 horas en el orden en que presentaron su calor.

El diagnóstico de gestación se realizó mediante un radioinmunoanálisis de los niveles de progesterona en plasma al día 18 post-inseminación, y aquellas con niveles de progesterona mayores a 1 ng/ml fueron consideradas gestantes, obteniendo así un porcentaje de fertilidad del 26.6 % por laparoscopia y del 0 % al inseminar por vía cervical, los resultados fueron confirmados tomando en cuenta el número de ovejas paridas. Al analizar estos resultados mediante la prueba de chi cuadrada si se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Se concluye que la fertilidad con semen congelado es mayor al depositar el semen directamente en la luz uterina por medio de la laparoscopia que al inseminar por vía vaginal en la os externa del cérvix. Se deben realizar más experimentos de este tipo para perfeccionar la técnica en poblaciones ovinas más grandes, modificando las pipetas de inseminación intrauterina y superando la calidad del semen.

2.0 INTRODUCCION

La inseminación artificial (IA) en ovinos es una alternativa para utilizar al máximo el potencial genético de los machos, además de tener otras ventajas como el optimizar el uso de los sementales, y controlar enfermedades contagiosas en los rebaños (9,16,33).

A pesar de que la IA se ha practicado desde 1907 (16,26), en ovinos ha tenido su mayor auge en los últimos 15 años, dando como resultado el aumento en la demanda para su uso en la industria ovina (16).

El método tradicional de IA en la borrega utiliza semen fresco diluido, se deposita el semen en la os externa del cervix, utilizando una pipeta plástica que se introduce a través de un espéculo vaginal (9,26,29). El semen debe ser depositado dentro de las primeras 24 horas de su colección (16). Otro método que se ha utilizado es la técnica vaginal, conocida comúnmente como "disparo en la obscuridad" (Fairnie & Wales (1982) citado por Maxwell, 26). Esta es una técnica simplificada en la que un gran volumen de semen fresco no diluido se deposita en la vagina utilizando una pipeta plástica, sin intento alguno de localizar el canal cervical(26,29). Kerton et al (1984) reportaron baja fertilidad al utilizar esta técnica (citado por Maxwell, 29).

Los métodos que utilizan semen recién colectado tienen uso limitado en los carneros que se localizan en un sitio remoto o que no están disponibles al momento del programa de IA. El uso de semen congelado es la única técnica que permite que un semental en particular cubra a un número determinado de hembras en un area geográfica extensa y en corto tiempo (17).

Se ha demostrado que el cervix constituye una barrera inicial en el ascenso de los espermatozoides, y relativamente pocos logran

alcanzar el sitio de fertilización (24,27). La información existente parece indicar que para obtener niveles de fertilidad aceptables mediante la IA, es necesario colocar el semen en el interior del canal cervical (intracervical), o de preferencia en la cavidad uterina (intrauterina). Este requisito resulta indispensable en la IA con semen congelado (34,40).

El almacenamiento de semen congelado proporciona a más productores la oportunidad de realizar la IA (16). Sin embargo, al inseminar por el método tradicional cervical con semen congelado, el índice de fertilidad es bajo (28,33,34). Esto se demostró desde 1958 cuando se reportó que los espermatozoides en el semen descongelado penetran más lentamente al cérvix craneal que los espermatozoides en el semen fresco (Lopyrin y Loginova (1958), citado por Maxwell, 26), además desde 1967, Lightfoot y Salamon encontraron cantidades muy bajas de espermatozoides en los oviductos de las borregas y baja fertilidad siguiendo la inseminación cervical con semen congelado (24,34). Se sabe que al utilizar esta técnica, parte importante del semen fluye hacia la vagina, muchos espermatozoides se pierden por drenaje, fagocitosis y desintegración. Por esta razón, un bajo número de células espermáticas entran a los genitales internos de la borrega. Esto se puede compensar hasta cierto grado, aumentando la concentración espermática en la dosis, pero el disminuir la dilución resulta en muerte espermática durante la congelación y descongelación. Una alternativa al utilizar esta técnica con semen congelado sería la centrifugación espermática antes de la inseminación (3), o bien, realizar inseminaciones dobles o triples (26).

El problema de baja fertilidad al inseminar con semen congelado puede ser superado al depositar el semen directamente en el útero

(6,24,25,27,). Sin embargo, en las borregas no es factible penetrar el cérvix y depositar el semen en el útero como se realiza en la vaca (9,10). La estructura anatómica del canal cervical de la borrega dificulta el paso de los instrumentos de IA que se han desarrollado para su uso en otros rumiantes domésticos, ya que contiene una serie de anillos en forma de embudo, y el paso transcervical se halla limitado por el segundo y tercer anillo, los cuales son excéntricos al resto del canal (18).

Se han realizado varios métodos de inseminación para superar el problema del deficiente transporte de los espermatozoides a nivel cervical al utilizar semen congelado.

Las primeras inseminaciones intrauterinas en ovejas fueron realizadas por Salamon y Lightfoot en 1967 al exponer el útero por medio de la laparotomía ventral media, y depositar el semen directamente en los cuernos u oviductos (34), ellos lograron un alto porcentaje de fertilidad (90.5%), pero encontraron alta mortalidad embrionaria y lo atribuyeron a "interferencia quirúrgica" (24,25). Posteriormente, Trounson y Moore (1974) demostraron que el rendimiento de embriones siguiendo la superovulación en borregas se aumenta al depositar el semen quirúrgicamente en el útero (39).

Otra técnica que se ha intentado realizar es la inseminación por vía peritoneal para hacer llegar a los espermatozoides a el sitio de fertilización. La información es escasa, pero involucra la deposición a ciegas del semen directamente en la cavidad peritoneal, en el área aproximada del ligamento ancho. Este método ha resultado exitoso en varias especies de aves y mamíferos y en 1981 se reportó su uso en borregos (Nogogatikov citado por Maxwell, 26). La fertilidad reportada fue prometedora, pero poco se conoce de esta

técnica de IA en borregos, y se requieren de más estudios para determinar si se puede aplicar con semen congelado (26).

El desarrollo de un programa de IA práctico y comercial utilizando semen congelado requiere de una técnica para depositar el semen en el útero a través del cérvix (18). La necesidad de desarrollar una técnica de IA adaptada especialmente a la anatomía de los genitales ovinos femeninos condujo a Andersen y cols. (1973) a describir una técnica mediante la cual el semen se deposita directamente en el útero por vía cervical sin la necesidad de recurrir a un procedimiento quirúrgico (3). Esta involucra la retracción del cérvix a la parte caudal de la pelvis, para que de esta manera se pueda manipular por vía rectal, facilitando así el paso de un catéter a través de los anillos cervicales y su introducción al útero para la deposición del semen. El resultado fue exitoso, existiendo una diferencia marcada entre la fertilidad intrauterina y cervical (3).

A partir de esta demostración, Fukui y Roberts (1977) investigaron una serie de procedimientos similares que involucran la penetración del canal cervical con una aguja hipodérmica, logrando depositar el semen hacia el final del canal cervical. Reportaron un mayor número de células espermáticas en el útero de las borregas 24 horas después de la inseminación con semen congelado utilizando esta técnica, que al inseminar por el método tradicional cervical. Sin embargo, la posibilidad de traumatizar el cérvix por este método lo hace impráctico (6,13). Posteriormente investigaron una técnica rápida de IA donde se utiliza el gas CO₂ para impulsar el semen al útero (14).

A pesar de todos estos intentos, la inseminación transcervical uterina en la borrega no se utiliza comercialmente (27), ya que se

requiere de un método práctico para la sujeción de la borrega que permita la introducción de un espéculo a la vagina. La localización, retracción y estabilización del cérvix es esencial para la introducción de los instrumentos de IA. La vagina debe estar a un nivel cómodo y práctico para el inseminador. La técnica debe ser repetible y con un mínimo de estrés a la borrega, sin resultar en trauma al tracto reproductivo (16).

Recientemente (1991), Halbert, Dobson y cols. realizaron un estudio donde se evaluaron y modificaron métodos de sujeción e instrumentación para la IA para producir una técnica transcervical intrauterina adecuada para su aplicación comercial, logrando una penetración uterina en un 82% de las ovejas (16,17).

El método de inseminación intrauterina usando un laparoscopio para visualizar el útero fue descrito por Killeen y Caffery en 1982 (21), y la técnica fue aplicada oportunamente para solucionar el problema de baja fertilidad que se obtiene al realizar la inseminación cervical con semen congelado (20). A partir de esto, se ha desarrollado más la técnica confirmando su valor para la inseminación de borregas superovuladas destinadas a la recuperación de embriones (5,6,20), y para la inseminación con semen congelado de borregas destinadas a la producción de corderos (5,20).

Trabajos más recientes han confirmado que el uso de esta técnica con semen congelado es tan efectiva como la inseminación artificial con semen fresco (21,26,27,33), o como la monta natural al primer estro post-sincronización (26). Más aún, las dosis de semen congelado requeridas son mucho menores que al inseminar con semen fresco por vía cervical (0.04ml con 40 millones de espermatozoides por laparoscopia vs. 0.2ml con 200 millones de espermatozoides por vía cervical) (26,33).

Este experimento fue diseñado para evaluar la eficacia y practicabilidad de la inseminación intrauterina por medio de un laparoscopio, utilizando semen congelado, y comparar los índices de fertilidad así obtenidos con los que se obtienen al inseminar con semen congelado por vía cervical en ovejas.

3.0 HIPOTESIS

La fertilidad en ovinos al utilizar semen congelado es mayor al depositar el semen directamente en el útero con un laparoscopio, que al inseminar por vía vaginal en la entrada del cervice.

4.0 OBJETIVO

Evaluar la técnica de inseminación intrauterina mediante laparoscopia utilizando semen congelado en ovinos, y comparar los resultados con aquellos obtenidos mediante inseminación cervical con semen congelado.

5.0 MATERIAL Y METODOS

El trabajo fue realizado en la ex-hacienda Zacatepec, localizada en el municipio Domingo Arenas en el estado de Tlaxcala.

La ex-hacienda Zacatepec se encuentra ubicada a 19° 25' latitud norte y 98° 8' longitud oeste, a una altura de 2408 msnm, con una precipitación pluvial anual promedio de 859.3 mm, siendo la época de lluvia de Mayo a Septiembre, y una temperatura promedio de 13.9 C (15).

5.1 Diseño Experimental

Se utilizó un total de 32 borregas las cuales fueron inseminadas con semen congelado. Estas fueron escogidas por disponibilidad sin tomar en cuenta edad, pariciones etc. El 50% (n=16) de las ovejas se inseminaron por vía vaginal, depositando el semen lo más profundo posible en el canal cervical (4), en el 50% restante (n=16) el semen se depositó directamente en el lumen uterino, vía la técnica de laparoscopia (11).

5.2 Colección y Almacenamiento del Semen

Se utilizaron tres carneros Suffolk del Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R.), localizado en el Km. 29.5 de la carretera federal México-Cuernavaca para obtener un total de 3 eyaculados por medio de una vagina artificial. El semen fue congelado por el método previamente descrito por Orizaga y cols. (1982), y almacenado en nitrógeno líquido a -196 C (31) en pajillas de 0.25 ml con una concentración de 300×10^6 espermatozoides.

Cuatro pajillas escogidas al azar fueron descongeladas a 37 C por 8 segundos (4) estas fueron evaluadas microscópicamente para determinar la concentración, y por computadora (CellSoft, CRYO

Resources, Ltd.) (8), para obtener valores de porcentaje de motilidad, velocidad y linealidad de los espermatozoides.

5.3 Tratamiento de Borregas y Manejo

Inicialmente las borregas fueron tratadas con implantes subcutáneos de 3 mg de Norgestomet (Synchromate B, Sanofi) en la oreja (1,7,37), por 7 días, seguido por una aplicación de 1 ml de prostaglandinas (Celosil, Ciba Geigy) al momento de retirar el implante, 8 borregas fueron inseminadas siguiendo este tratamiento por vía cervical. Posteriormente se modificó el tratamiento y en las 24 borregas restantes se aplicó el Norgestomet por 14 días, seguido por una dosis intramuscular de 400 UI de PMSG (Folligon, Intervet) al momento de retirar el implante.

Las inseminaciones se realizaron al primer estro posterior a la sincronización. La detección de calores se realizó con carneros provistos de un mandil, haciendo la detección por la mañana (7:00) y en la tarde (15:00). Las hembras que presentaron el celo en la mañana se inseminaron en la tarde y las que lo presentaron en la tarde se inseminaron en la mañana del día siguiente (30).

5.4 Inseminación Cervical

La inseminación cervical se realizó en 16 borregas al azar. El semen fue descongelado a 36 C durante 8 segundos (4), y se inseminaron las borregas elevando los cuartos traseros, depositando el semen en la entrada del cérvix por vía vaginal, a través de una pipeta plástica (4,26), utilizando un espéculo de pico de pato con iluminación propia (4). Cada borrega recibió 0.25 ml de semen con 300×10^6 espermatozoides en una sola inseminación (2).

5.5 Inseminación Intrauterina

Esta técnica se realizó en 16 ovejas, las cuales fueron dietadas por 12 horas antes de ser inseminadas.

El laparoscopio utilizado es un tubo de 30 cm de longitud por 10 mm de diámetro (32,36)(ver figura 1). Este se introduce a la cavidad abdominal a través de un trocar canula (figura 1,2). La fuente de luz fría es un proyector que se localiza fuera del abdomen (figura 3) y la luz se transmite a través de una fibra óptica flexible de 100 cm de largo y 4 mm de diámetro (5,32,36).

Las pipetas que se utilizaron consisten de una aguja hipodérmica calibre 25 de media pulgada de largo, conectada por presión a la pipeta de inseminación comúnmente utilizada para la inseminación del ganado bovino, con un diámetro interno de 2 mm, y 43 cm de longitud (figura 1). La pajilla descongelada se colocó dentro de la pipeta de inseminación y el semen fue impulsado con aire utilizando una jeringa de 20 ml conectada al extremo de la pipeta opuesto a la aguja. Como auxiliar en la manipulación del útero se utilizó una barra de cobre de 60 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro con una muesca triangular cerca de la punta (figura 1). Para la insuflación de la cavidad abdominal se utilizó una aguja de Verres (36)(figura 1).

Los pasos para la inseminación intrauterina por laparoscopia fueron similares a los descritos por Evans y Maxwell en 1990 (11), con la excepción de que la pipeta de inseminación fue introducida a través de la cánula en el cuerpo del telescopio por el lado izquierdo de la borrega, y no por un trocar de 5 mm por el lado derecho. Asimismo, se introdujo un manipulador directamente en la cavidad intraperitoneal sin el uso de un trocar por el lado derecho.

Cada cuerno uterino recibió media pajilla, lo que equivale a 0.125 ml de semen con 150×10^6 espermatozoides, dando un total de 0.25 ml con 300×10^6 espermatozoides por borrega.

5.6 Evaluación de los Resultados

A cada borrega se le tomó una muestra sanguínea de la vena yugular 18 días después de la IA para realizar el diagnóstico de gestación mediante un radioinmunoanálisis rápido de los niveles de progesterona en plasma (12). Las borregas con niveles de progesterona de 1 ng/ml o más fueron reconocidas como gestantes (12).

El diagnóstico de gestación fue comprobado con el nacimiento de los corderos.

La significancia estadística existente entre el índice de fertilidad obtenido en los dos grupos analizados fue determinada mediante la prueba de homogeneidad (38).

6.0 RESULTADOS

Se obtuvieron índices de fertilidad muy bajos en ambos grupos, aquellas borregas que presentaron niveles de progesterona mayores a 1 ng/ml en plasma al día 18 post-inseminación fueron consideradas gestantes (ver gráfica 1 y 2), resultando solamente 4 borregas gestantes en el grupo de inseminación intrauterina y ninguna gestante en el grupo control de inseminación cervical. Estos resultados fueron confirmados por el número de borregas paridas a los 150 días (ver figura 4 y 5). Se consideran solamente 15 borregas por laparoscopia debido a que una de ellas no se logró inseminar ya que presentaba mucho líquido en cavidad abdominal (ascitis) y presentó vómito por lo que se interrumpió la intervención (ver cuadro 1).

Con respecto a los valores de progesterona en plasma en el día 18 post-inseminación, sí se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) al comparar los porcentajes de fertilidad en cada grupo.

Al analizar el semen descongelado microscópicamente se encontró una concentración de aproximadamente 300×10^6 espermatozoides por 0.25 ml, al analizarlo por computadora (CellSoft, CRYO Resources, Ltd.), se encontró un 34.8 % de motilidad, con una velocidad media de 29 micrones/segundo y una linealidad media de 3.3.

Cuadro #1. Resultados obtenidos en ovejas inseminadas con semen congelado por laparoscopia y por inseminación cervical.

| | n | <u>OVEJAS GESTANTES</u> (número) (%) | |
|--------------------------------------|----|---|----------|
| Inseminación por Laparoscopia | 15 | 4 | (26.6) a |
| Inseminación Cervical | 16 | 0 | (0) b |
| Total | 31 | 4 | (12.9) |

A valores con diferente literal, diferencias significativas.

7.0 DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran porcentajes de fertilidad muy bajos cuando se comparan con los resultados que se han obtenido por otros autores (26,27,28), sin embargo parecen indicar que la técnica laparoscópica es la de elección cuando se pretende inseminar a las ovejas con semen congelado.

Existen diversos factores que pueden ejercer una influencia negativa sobre la fertilidad en borregas, y el número reducido de animales en cada grupo experimental aumenta el riesgo de obtener resultados negativos en un experimento de este tipo.

Se conoce que la fertilidad al depositar el semen en la entrada del cérvix por vía vaginal es baja al utilizar semen congelado (3,6,25,26). El obstáculo principal a la fertilidad es el establecimiento de una población insuficiente de espermatozoides viables en el cérvix y el deficiente transporte de éstos por el aparato genital de la borrega (24,26). Además en este experimento el 50 % de las borregas inseminadas por vía cervical (n=8) recibieron un tratamiento de sincronización diferente en el que no se inyectó PMSG al momento de retirar el implante. Se conoce que los tratamientos de sincronización tienen un efecto negativo sobre la fertilidad siguiendo la inseminación del primer estro (19,35). Esto se puede prevenir al tratarlas con una dosis intramuscular de PMSG al momento de retirar el implante para proporcionar así una mejor sincronización y ovulación (26, 22). Más aún, cuando no se utiliza PMSG, algunos autores recomiendan realizar 2 o más inseminaciones en un periodo de tiempo más largo para alcanzar la misma fertilidad que al utilizar PMSG (22,23). Se ha demostrado una disminución en el porcentaje de fertilidad cuando el estro se sincroniza con prostaglandinas, debido a una menor población de espermatozoides en los oviductos al tiempo

de ovulación (42). No se puede aclarar con seguridad que tanto pudo afectar el régimen de sincronización alterno que recibieron esas 8 borregas sobre la fertilidad, indudablemente no fue beneficioso, y sin excepción alguna se debe continuar inyectando 400-500 U.I. de PMSG en borregas destinadas a la IA intrauterina. Aunque no se ha investigado el valor real de esta hormona en la borrega, Killeen (20) recomienda continuar su aplicación para asegurar los mejores resultados posibles, ya que su alto costo puede ser cubierto por los partos gemelares extras.

La baja fertilidad obtenida al inseminar por laparoscopia no se puede atribuir al tratamiento de sincronización ya que todas recibieron 400 UI de PMSG, que hasta cierto punto contraresta los efectos negativos de la inseminación al primer estro siguiendo el tratamiento con progestágenos (23,26). Sin embargo, el uso de la laparoscopia en la industria ovina, es todavía una herramienta joven en nuestro país. Si bien, cualquier vía de IA en ovinos en México se ha realizado solamente a nivel experimental y en casos aislados en programas de extensionismo con los productores de rebaños mantenidos en condiciones de pastoreo, y en el C.E.P.I.E.R. antes C.O.P.E.A., explotación intensiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.(40). El equipo utilizado para la IA por laparoscopia es caro y de importación, y con la excepción del laparoscopio propiamente dicho, el resto del equipo (manipuladores y pipetas de IA), fue sustituido por implementos de fácil construcción y bajo costo. Es importante que la borrega esté cómoda para disminuir el estrés, y a una altura adecuada para el inseminador, la camilla de sujeción también fue construida a bajo costo. Desafortunadamente, las pipetas resultaron imprácticas ya que parte importante del semen se perdió en las paredes de las mismas, y en

algunos caso el semen se veía gotear hacia la cavidad peritoneal. También cabe la posibilidad de que al momento de introducir la aguja de la pipeta en la cavidad del cuerno uterino, el inseminado se depositara ya sea dentro de la pared del útero, o bien pasara a la cavidad abdominal. No cabe duda que la falta de experiencia pudo influenciar en parte sobre la baja fertilidad obtenida y se requiere de más trabajos para perfeccionar los instrumentos y adquirir mayor destreza.

La época reproductiva en ovinos en México abarca los meses de Octubre a Marzo aproximadamente (41), las inseminaciones se realizaron hacia el final de la época en enero-marzo, y es posible, aunque especulativo, atribuir la baja fertilidad a que algunas de las borregas disponibles fueron aquellas que por diversos factores no quedaron gestantes más temprano en la temporada al recibir montas naturales. El hecho de que la época de nuestro se aproximaba, pudo contribuir a la baja fertilidad.

Maxwell (1984), demostró que al inseminar con semen congelado por laparoscopia el tiempo óptimo para inseminar es a las 66 horas después de retirar el progestágeno (26). En el presente trabajo existió variabilidad desde 48-72 horas aproximadamente, dependiendo de como fueran presentando calores las borregas, las borregas que quedaron gestantes se inseminaron de 48-50 horas después de retirar el implante, basado en que pasaran 12 horas posteriores a la detección del estro. En borregas, la muerte embrionaria es alta aún siguiendo la monta natural (Edey (1976) citado por Maxwell, 27), y la situación se puede agravar tras una inseminación sujeta a envejecimiento. La alta mortalidad embrionaria que se ha obtenido al inseminar por laparoscopia, acentúa la importancia que tiene el tiempo de deposición del inseminado para así evitar envejecimiento

adicional de los espermatozoides (27). Los espermatozoides que se depositan en etapas muy tempranas (24-36 h) de retirar el implante se exponen a mayor envejecimiento en el aparato genital de la borrega que los espermatozoides depositados cerca del tiempo de ovulación (48-60 h después de retirar el implante)(27). También se ha sugerido que al inseminarlas cerca al tiempo de ovulación (54-60 horas), pudiera resultar en una disminución en la tasa de fertilización (6).

Otro factor que se considera importante es la concentración de espermatozoides móviles en el inseminado (28). Todavía no se conoce la dosis mínima de espermatozoides que se requiere para la IA intrauterina por laparoscopia (6). Killeen (1982) utilizó una dosis de 120×10^6 espermatozoides por borrega (21), y Davis (1984) utilizó 50×10^6 espermatozoides por borrega (9). En el presente trabajo se utilizó una dosis de 300×10^6 espermatozoides, el análisis por computadora reveló que el porcentaje de células móviles fue el predeterminado (34.8% de motilidad, normal en bovinos 34% con un rango de 26-44%)(8), sin embargo la calidad de este movimiento era inadecuado al compararse con los valores obtenidos en el ganado bovino (8), ya que se encontró una velocidad media de 29 micrones/segundo (normal en bovinos es de 49-80 micrones/segundo)(8) y una linealidad media de 3.3 (normal en bovinos es de 5.3-6.5)(8), la baja velocidad y falta de linealidad en el movimiento pudo limitar el transporte de estos por el aparato genital femenino, lo que ofrece una explicación para la baja fertilidad obtenida.

Se requieren de más estudios para determinar los factores que afectan la concepción para mejorar los resultados globales de programas de IA. Por ejemplo, todavía no se conoce el tiempo óptimo para realizar la inseminación, así como el diluyente ideal para el semen de carnero o el número óptimo de espermatozoides por dosis

(17). Por lo pronto se puede recomendar esta técnica en rebaños sanos y bien nutridos, utilizando pipetas de mayor calidad funcional y semen con características óptimas de motilidad.

8.0 CONCLUSION

La fertilidad con semen congelado es mayor al depositar el semen directamente en la luz uterina por medio de la laparoscopia que al inseminar por vía vaginal en la os externa del cérvix.

Los porcentajes de fertilidad obtenidos se pueden aumentar al utilizar semen con mejores características de motilidad.

Se recomienda perfeccionar las pipetas de inseminación intrauterina para evitar el desperdicio y pérdidas importantes de semen al momento de introducir las pajillas.

Se requieren de más estudios utilizando grupos poblacionales más grandes y más estables en cuanto a edad, número de pariciones etc. para obtener resultados más representativos.

9.0 L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Ainsworth, L. and Wolynetz, M.S.: Synchronization of estrus and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestogens administered by subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. Journal of Animal Science, **54**: 1120-1127 (1982).
2. Alvarez, P.H.M.: Comparación de la fertilidad obtenida en ovejas inseminadas con semen fresco diluido y semen congelado. Tesis de licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zootec. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
3. Andersen, K.; Aamdal, J. and Fougner, J.A.: Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. Zuchtbygieng., **8**: 113-118 (1973).
4. Angulo, M.R.B.: Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen de ovino. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
5. Aragunde, M.; Perdigón, F.; Carbo, A.; Bonifancio, L. y Maccira, P.: Revisión de técnicas de laparoscopia especialmente aplicada a reproducción animal. XIV Jornadas Uruguayas de Bujatría., Paysandú, R.O.U. 28-30 de Mayo, 1986.
6. Armstrong, D.T. and Evans, G.: Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. J. Reprod. Fert., **71**: 89-94 (1984).
7. Bretzlaff, K.N. and Madrid, N.: Synchronization of estrus and fertility in goats with Norgestomet ear implants. Theriogenology, **24**: 351-357 (1985).
8. Budworth, P.R.; Amann, R.P. and Chapman, P.L.: Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. Journal of Andrology, **9**: 41-53 (1988).

9. Davis, I.F.; Kerton, D.J. and Mc.Phee, S.R.: Uterine artificial insemination in ewes. In: *Reproduction in Sheep*. Ed. Lindsay, D.R. and Pearse, D.T. 304-305. Cambridge University Press, Cambridge. (1984).
10. Dun, R.B.: The cervix of the ewe- its importance in artificial insemination of sheep. Aust. Vet. J., **31**: 101-103 (1955).
11. Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. Editorial Acribia S.A.. Zaragoza, España. 1990.
12. Flores, P.A.G.: Diagnóstico de gestación en ovejas mediante un radioinmunoanálisis rápido de los niveles de progesterona en el día 18 post-servicio. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1988.
13. Fukui, Y. and Roberts, E.M.: Sperm transport after non-surgical intrauterine insemination with frozen semen in ewes treated with prostaglandin F-2 alfa. J. Reprod. Fert., **51**: 141-143 (1977).
14. Fukui, Y. and Roberts, E.M.: Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. Theriogenology, **10**: 381-386 (1978).
15. Garcia, M.E.: Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 3a edición. Offset Larios, México, D.F., 1981.
16. Halbert, G.W.; Dobson, H. and Walton, J.S.: A technique for transcervical intrauterine insemination in ewes. Theriogenology, **33**: 993-1010 (1990).
17. Halbert, G.W.; Dobson, H. and Walton, J.S.: Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. Theriogenology, **33**: 1231-1243 (1990).
18. Halbert, G.W.; Dobson, H.; Walton, J.S. and Buckrell, B.C.: The structure of the cervical canal of the ewe. Theriogenology, **33**: 977-992 (1990).

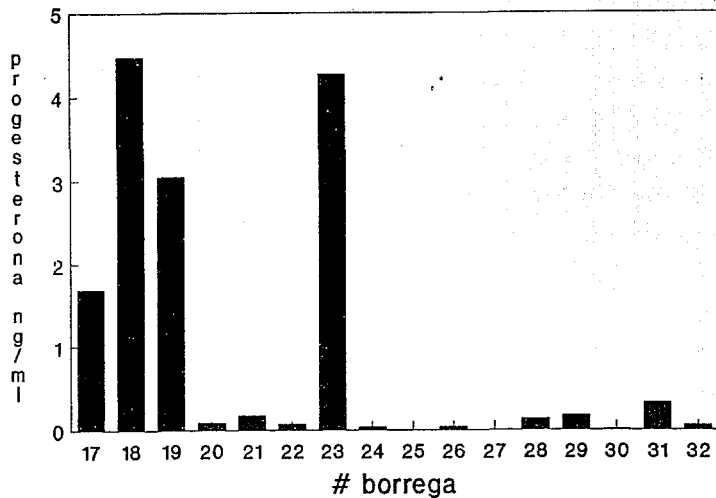
19. Hawk, H.W.; Cooper, B.S. and Pursel, V.G.: Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. J. of Animal Sci., 52: 601-610 (1981).
20. Killeen, I.D.: Use of laparoscopy for artificial insemination of sheep. XIV Jornadas Uruguayas de Buiatria., Paysandu, R.O.U. 28-30 de Mayo, 1986.
21. Killeen, I.D. and Caffery, G.J.: Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. Aust. Vet. J., 59 (1982).
22. Langford, G.A.: Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progestogen treated sheep in confinement. J. of Animal Sci., 54: 1205-1210 (1982).
23. Langford, G.A.; Marcus, G.J. and Batra, T.R.: Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogen-treated sheep. J. of Animal Sci., 57: 307-312 (1983).
24. Lightfoot, R.J. and Salamon, S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fert., 22: 385-398 (1970).
25. Lightfoot, R.J. and Salamon, S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. II the effect of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. J. Reprod. Fert., 22: 399-408 (1970).
26. Maxwell, W.M.C.: Current problems and future potential of artificial insemination programs. In. Reproduction in Sheep. Ed. Lindsay, D.R. and Pearse, D.T. 291-197. Cambridge University Press, Cambridge. (1984).
27. Maxwell, W.M.C. and Butler, L.G.: Intra-uterine insemination of ewes with frozen semen. J. Agric. Sci. Camb., 102: 233-235 (1984).

28. Maxwell, W.M.C.; Curnock, R.M.; Logue, D.N. and Reed, H.C.B.: Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws, a preliminary report. Theriogenology, **14**: 82-89 (1980).
29. Maxwell, W.M.C. and Hewitt, L.J.: A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. J. Agric. Sci. Camb., **106**: 191-193 (1986).
30. Miller, S.J.: Artificial breeding in sheep. Current therapy in theriogenology. Edited by: Morrow, D.; Vol X: 947-950 (1979). Citado por Angulo, M.R.: Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen de ovino. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1988.
31. Orizaga, J.A.: Efecto del congelamiento sobre la movilidad progresiva y la estructura acrosomal del espermatozoide del morueco. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1982.
32. Quiñonez, Z.C.: Laparoscopia: instrumentación y técnica. Memorias del curso teórico práctico "Laparoscopia en Ginecología". Asociación Mexicana de Ginecología y Obstetricia. 4-8 de Junio (1984).
33. Rival, M.D.; Chenoweth, P.J and McMicking, L.L.: Semen deposition and fertility in ovine artificial breeding programmes. In: Reproduction in sheep. Ed. Lindsay, D.R. and Pearse, D.T. 301-303 Cambridge University Press, Cambridge. (1984).
34. Salamon, S. and Lightfoot, R.J.: Fertilization and embryonic loss in sheep after insemination with deep frozen semen. Nature, **216**: 194-195 (1967).
35. Scaramuzzi, R.J. and Martin, G.B.: Pharmacological agents for manipulating oestrus and ovulation in the ewe. In: Reproduction in

- Sheep. Ed. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. 316-325 Cambridge University Press, Cambridge. (1984).
36. Seeger, K. and Klatt, P.R.: Laparoscopy in the sheep and goat, In: Animal Laparoscopy. 6th edition. Harrison, R.M. and De Wildt, Baltimore pp. 107-120 (1980).
37. Spitzer, J.C. and Carpenter, R.M.: Estrus and pregnancy rates following synchronization with chronolone intravaginal sponge or norgestomet ear implant in cycling ewes. Theriogenology, 16: 287-294 (1981).
38. Steel, R.G. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. Mc. Graw-Hill Kogakusha, LTD, 2nd Edition, (1980).
39. Trounson, A.O. and Moore, N.W.: Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination. Aust. J. Biol. Sci., 27: 301 (1974).
40. Valencia, J.: La inseminación artificial en ovinos. En: Memorias Curso Actualización "Bases de la Cría Ovina". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia / Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Universidad Nacional Autónoma de México, Pachuca, Hidalgo. pp.25-29 (1987).
41. Valencia, J. y Bustamante, G.: Ovinos y Caprinos. En: Reproducción de Animales Domésticos. Ed. Limusa. México, D.F. 1986.
42. Walker, S.K. and Warnes, G.M.: Artificial insemination and transfer of embryos by laparoscopy. In: Reproduction in sheep. Ed. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. 306-309 Cambridge University Press, Cambridge. (1984).

10.0 ANEXOS

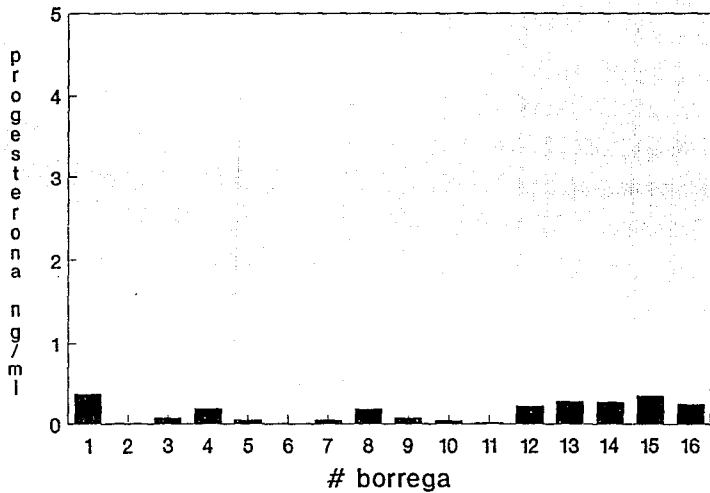
Niveles de Progesterona al Día 18 Post-Inseminación Intrauterina



26

Grafica #1

Niveles de Progesterona al Día 18 Post-Inseminación Intracervical



Grafica #2

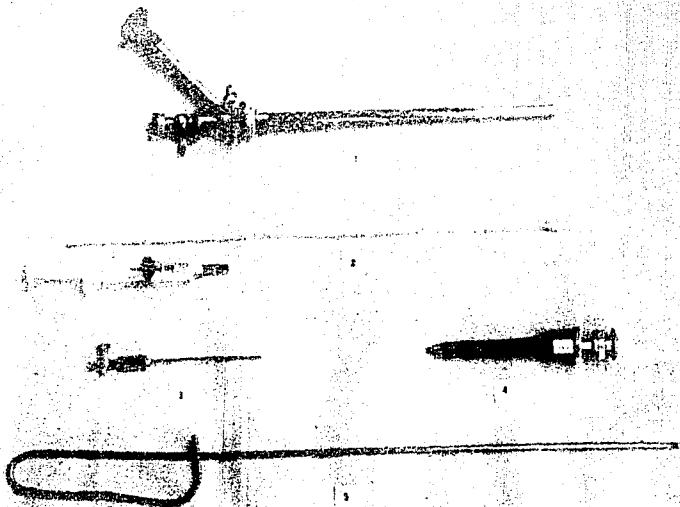


Figura #1. Material utilizado para la IA por laparoscopia.
1.Laparoscopio operatorio 10 mm diámetro 2.Pipeta de IA 3.Aguja de
verres 4.Trocar canula 11 mm diámetro 5.Manipulador.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

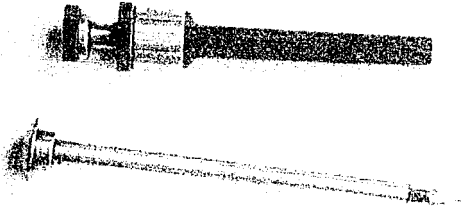


Figura #2. Trocar canula desarmado.

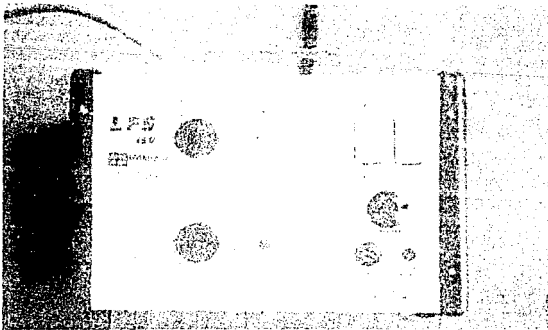


Figura #3. Fuente de Luz.



Figura #4. Cordero Suffolk/Rambouillet, producto de la IA por laparoscopia.



Figura #5. Cordero Suffolk/Rambouillet, producto de la IA por laparoscopia.