

37
2g



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“COMPARACION DE DOS DIFERENTES DILUYENTES PARA INSEMINACION ARTIFICIAL EN OVEJAS”

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Mario Iván Córdova Soto

**Asesores: M.V.Z. Deborah Feldman Steele
M.V.Z. Antonio Ortiz Hernández
M.V.Z. Javier Valencia Méndez**

México, D. F.

1987





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

	<u>PAGINA</u>
I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	2
III.- MATERIAL Y METODOS.....	6
IV.- RESULTADOS.....	9
V.- DISCUSION.....	14
VI.- LITERATURA CITADA.....	16

RESUMEN

Córdova Soto Mario Iván. COMPARACION DE DOS DIFERENTES DILUYENTES PARA LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN OVEJAS (bajo la dirección de M.V.Z. Deborah Feldman Steele, M.V.Z. Javier Valencia Méndez y M.V.Z. Antonio Ortiz Hernández).

El objetivo del presente estudio fue comparar la fertilidad obtenida al inseminar ovejas con semen fresco y refrigerado utilizando dos diferentes diluyentes. El experimento se llevó a cabo en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron 137 hembras y 4 sementales. El semen se obtuvo con vagina artificial y se dividió en dos partes iguales; la primera se diluyó en una solución de citrato de sodio y ácido cítrico y la segunda en leche ultrapasteurizada adicionada de antibióticos. Cada dosis contenía 300 millones de espermatozoides móviles. La detección de calores se realizó dos veces al día con machos vasectomizados. Las hembras encontradas en calor en la mañana se inseminaron en la tarde con semen refrigerado durante aproximadamente 8 horas mantenido a 15 C y las detectadas en la tarde se inseminaron a la mañana siguiente con semen fresco. La inseminación fue intracervical profunda. El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonido 60 días después del servicio. Con la utilización del semen fresco 78.3 y 71.8 % de las ovejas quedaron gestantes y con semen refrigerado 73.5 y 68.6% (semen diluido con citrato de sodio/ácido cítrico y leche ultrapasteurizada respectivamente). No hubo diferencia significativa al comparar el semen fresco y refrigerado ni tampoco al comparar diluyentes. El diluyente elaborado con citrato de sodio y ácido cítrico resultó ser más barato y fácil de preparar.

INTRODUCCION

HISTORIA

La inseminación artificial es el método de reproducción en el cual las células masculinas son transportadas al aparato genital femenino a través de medios mecánicos que sustituyen el contacto sexual de la hembra y el macho (7).

Ivanov es reconocido como el verdadero precursor de la inseminación artificial de las especies domésticas, ya que a principios de este siglo fué el primero en inseminar hembras bovinas y ovinas en Rusia (7).

Poco tiempo después, en 1914, el italiano Amantea construye el primer modelo de vagina artificial eliminando así el método antiguo de obtención de semen, el cual consistía en extraer el semen directamente de la vagina de la hembra recién servida (7).

Ivanov en 1928 realiza un trabajo en gran escala inseminando a 4700 ovejas [7].

En 1930 los rusos empezaron a utilizar la leche de bovino como diluyente del semen, encontrando al principio algunos obstáculos como la muerte de los espermatozoides debida a un deficiente control en la temperatura de la leche, y a la falta de control en la calidad de la misma [2].

En 1939 Phillips y Lardy elaboraron un diluyente para prolongar la vida del espermatozoide por varios días. Estaba constituido por fosfato de sodio, fosfato de potasio y yema de huevo. Hasta este momento sólo se pensaba en un diluyente como una forma para hacer que el eyaculado del macho sirviera para inseminar a varias hembras, pero no se había elaborado un diluyente que sirviera para aumentar el tiempo de almacenaje (7, 2, 14).

En 1940 Shettles demostró que la aplicación de la sulfanilamida frenaba el crecimiento bacteriano y no afectaba a la vitalidad espermática (13,15). Salisbury comprobó que la aplicación de sulfanilamida al semen y la disminución de la temperatura del mismo por medio de

refrigeración aumentaba significativamente la capacidad fecundante del semen (16).

Salisbury en 1942 sustituye a los fosfatos por citratos, argumentando que estos últimos permiten una mejor visualización y evaluación de los espermatozoides bajo el lente del microscopio (14).

Almquist en 1946 demuestra que la penicilina no afecta a la motilidad ni a la fecundidad seminal y en cambio si disminuye la multiplicación bacteriana (5,16).

Poco después se adiciona a los diluyentes la estreptomycin, ya que la penicilina y la sulfanilamida no eran lo suficientemente eficaces para poder frenar en forma total el crecimiento bacteriano (6).

En 1949 Polge, Smith y Parkes adicionan el glicerol como componente del diluyente para la técnica de congelación del semen a 79 C bajo cero. Y es así como se prolonga la vida del espermatozoide casi indefinidamente (7).

Hoy en día Rusia sigue siendo el país con mayor población ovina y en donde se inseminan más hembras de dicha especie en el mundo. Anualmente inseminan de 42 a 44 millones de ovejas, lo que representa un 72-76% de su población total. En las regiones donde el desarrollo ovino es mejor, el 90-95% de las borregas son inseminadas (10).

La amplia difusión de la inseminación artificial en Rusia es debida en gran parte a que los rebaños son de 3,000 hasta 60,000, ovinos los cuales se encuentran lotificados en grupos de 600-800 animales (10).

Es importante hacer notar que no basta con encontrar un diluyente que dé como resultado el mejor porcentaje de fertilidad, sino que además éste sea fácil de preparar, de manejar, que tenga un bajo costo y que los componentes se consigan fácilmente (12).

Un diluyente idóneo tiene que ser isotónico, tener un pH óptimo además de un cierto poder amortiguador, ya que el semen, en especial el de los rumiantes con alta concentración de espermatozoides, sufre una acidificación

rápida. Debe tener sustancias como prótidos y glúcidos que favorezcan el metabolismo espermático, y en caso de contener alguna sustancia que sea un buen medio para el crecimiento bacteriano, se requerirá del uso de antibióticos (2,13).

Los componentes de los diluyentes más estudiados y usados son la leche de vaca, el citrato de sodio, la yema de huevo, la glucosa, los fosfatos y el glicerol. La mayoría de éstos se han utilizado solos o en combinaciones. Otros componentes menos usados son el ácido glutámico, la sangre, el agua de coco la lecitina y otros más (16).

La leche de vaca se ha utilizado ampliamente debido a que proporciona a los espermatozoides glúcidos como la lactosa, que regula la presión osmótica también proporciona lípidos y otras sustancias como fosfatos y citratos que ayudan al metabolismo espermático (6,12).

Cuando se utiliza la leche como diluyente del semen deberá someterse a ebullición durante 10 minutos para así poder neutralizar ciertas sustancias como la lactenina que es tóxica para los espermatozoide (6,12).

La leche ultrapasteurizada (UP), al ser parcialmente descremada, contiene un mínimo de grasa, lo que permite una mejor observación del semen ante el microscopio y además los espermatozoides al ser inseminados se mueven más fácilmente. Otra ventaja de la leche U.P. es que no provoca aglutinación. Además es barata, estéril, no requiere de un nuevo calentamiento ni de refrigeración y se puede conseguir fácilmente (2).

Es de suma importancia que el diluyente controle el pH del semen, ya que el metabolismo espermático produce la acidificación del semen y consecuentemente la muerte de los espermatozoides. El pH óptimo del semen de ovino es de 5.9 a 7.3 con un promedio de 6.9 (13,14).

Anteriormente eran utilizadas soluciones de fosfatos como amortiguadores del semen, sin embargo más tarde se utilizó el citrato de sodio, debido a que además de ser un excelente amortiguador, es un agente quelante que se fija

sólidamente al calcio y a otros iones metálicos. Además permite una mejor observación de las células espermáticas con el microscópio (6,14). El citrato tiene otras ventajas, como la de ser fácil de preparar, práctico y económico (6).

Según Derivaux es Schersten el primer investigador que demostró la presencia de ácido cítrico en el semen del humano y de los animales, argumentando que la capacidad amortiguadora del semen era debida en gran parte al contenido de citratos lograndose prolongar la vitalidad espermática al añadir citrato de sodio al diluyente seminal (6,16).

Zlatarev recientemente ha desarrollado un diluyente llamado "Vellon Dorado" constituido por una solución de citrato de sodio y ácido cítrico (17). Este diluyente mantiene el pH aproximadamente a 6.4, lo que contribuye a disminuir el metabolismo de los espermatozoides¹

OBJETIVOS:

Comparar la fertilidad que se obtiene al inseminar a las ovejas con semen diluido con leche y con un diluyente a base de citrato de sodio y ácido cítrico. Asimismo comparar la facilidad y costo de elaboración y el efecto del almacenaje de los diluyentes.

HIPOTESIS:

Al utilizar el semen diluido con leche y antibióticos se obtendrá un mayor porcentaje de fertilidad ya que contiene lípidos, glúcidos y prótidos, los cuales ayudan al metabolismo espermático, mientras que el diluyente con citrato de sodio y ácido cítrico no tiene estos compuestos.

¹ Zlatarev, S., Comunicación Personal, 1985.

MATERIAL Y METODO.

LOCALIZACION GEOGRAFICA

El presente trabajo se llevó a cabo en el CENTRO OVINO DEL PROGRAMA DE EXTENSION AGROPECUARIA (C.O.P.E.A.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, el cual se encuentra ubicado en Topilejo, delegación TLALPAN, D.F. a 19° 10' Latitud Norte y 99° 10' Longitud Oeste a una altitud de 2760 m. sobre el nivel del mar. El clima del lugar es semifrío-subhúmedo, con lluvias en verano y una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm. La temperatura promedio anual es de 19 C (9).

MATERIAL ANIMAL.

Se empleó un total de 137 hembras de las razas Suffolk, Polled Dorset, Tarsset y sus cruizas, además de 4 sementales de la raza Suffolk, manteniendolos bajo condiciones de explotación intensiva.

Los animales fueron alimentados con heno de avena, ensilado de avena y concentrado.

Las hembras se dividieron al azar en dos grupos, el (A) se inseminó con semen diluido con citrato de sodio y ácido cítrico y el grupo (B) se inseminó con semen diluido con leche.

PROCEDIMIENTO.

La colección del semen se realizó diariamente a las 7 A.M. utilizando una vagina artificial. Se empleó a una hembra en calor como estafaulo (15).

Una vez obtenido el semen se depositó en un termo a una temperatura de 35 C (15).

En el laboratorio se procedió a diluir el semen, realizando previamente la evaluación de las siguientes características:

- VOLUMEN
- MOTILIDAD (MOVIMIENTO EN MASA Y MOVIMIENTO PROGRESIVO)
- CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDES POR ml.
- DETERMINACION DE ANOMALIAS MORFOLOGICAS (3, 11, 14, 15).

El semen se mantuvo en baño María a una temperatura de 30 C.

Sólo se utilizaron los eyaculados que contenían más de 2000 millones de espermatozoides por ml, con un movimiento progresivo de 70 % y menos del 15% de anormalidades (12,14).

Tomando en cuenta el volumen y la concentración espermática del eyaculado calculada por el método del hemocitómetro, se calculó el número de dosis posibles. Cada dosis contenía 300 millones de espermatozoides móviles.

Cada eyaculado se dividió en dos partes iguales. La primera mitad se diluyó con citrato y ácido cítrico (A), y la segunda mitad se diluyó en leche (B).

El diluyente (A) contenía 2.8 g. de citrato de sodio, 0.8 g. de ácido cítrico, los cuales se diluyeron en 100 ml de agua bidestilada.

El diluyente (B) contenía 100 ml de leche U.P., 0.1 g. de estreptomycin¹ (0.4 ml) y 100,000 U.I. de penicilina (0.4 ml)². Estos antibióticos se diluyeron previamente en 4 ml leche en lugar de agua destilada. Posteriormente se adicionó 0.3 g. de Sulfanilamida.

El diluyente y el semen se mantuvieron en baño María a una temperatura de 30 C (10).

Una vez diluido el semen se colocó tapado en baño María y se introdujo en el refrigerador para que la temperatura descendiera paulatinamente a 15 C en 20 minutos (7).

Las pajillas de 0.25 ml se enfriaron a 15 C en el termo con ácido acético glacial y se llenaron con una jeringa adicionada de una manguera. Se sellaron con alcohol polivinílico, y finalmente se identificaron con el número de semental y con un color para cada diluyente.

Las pajillas se guardaron en un termo de boca ancha rodeadas de tubos de ensayo con ácido acético glacial en estado sólido para mantener la temperatura a 15 C.

La detección de calores se llevó a cabo dos veces al día utilizando machos con mandíles. Las hembras detectadas

¹ ESTREPTOMICINA "S" DE 1g. LABORATORIOS LAKESIDE, S.A.
² PENICILINA G SAL SODICA CRISTALIZADA LAKESIDE DE 100000 U.I. LAB. LAKESIDE, S.A.

en calor se separaron de sus corrales. Las hembras detectadas a las 7 A.M. se inseminaron a las 4 P.M., y las borregas detectadas a las 2 P.M. se inseminaron a las 8:00 A.M. del siguiente día.

Se utilizó el instrumental de inseminación que consta de un aplicador con sus fundas desechables y puntas flexibles para pajillas de 0.25 ml. (12).

Con la ayuda de un espéculo de pico de pato, con iluminación propia, se localizó el cervix y se depositó el semen intracervicalmente lo más profundo posible (13).

Las hembras así inseminadas permanecieron 3 minutos en el potro de inseminación con el tren posterior levantado. Después de ser inseminada cada borrega se lavó el espéculo con una solución de benzal y se enjuagó con agua limpia y se secó.

Las ovejas se marcaron con un crayón y se metieron a un corral después de haber sido inseminadas.

Se continuó realizando la detección de calores para determinar aquellas ovejas inseminadas que no quedaron gestantes y que volvieron a presentar celo.

El diagnóstico de gestación se realizó por el método de ultrasonido aproximadamente 60 días después de la inseminación artificial (1). El porcentaje de gestación obtenido en las ovejas inseminadas con semen diluido utilizando los dos diluyentes fue analizado por medio de una prueba de hipótesis comparando las proporciones, utilizando una prueba de Z (5).

¹ I.M.V. (Instruments de Médecine Vétérinaire) Francia.

RESULTADOS

El 70.1 % de las ovejas inseminadas con el diluyente de leche y el 76.1% de las ovejas inseminadas con el diluyente de citrato quedaron gestantes. No se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar la fertilidad de las ovejas al utilizar los dos diluyentes (Cuadro 1).

Al comparar la fertilidad de los diluyentes en sus presentaciones fresca y refrigerada, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$), siendo para la forma fresca 78.3 y 71.8 (citrato y leche, respectivamente) ó en su forma refrigerada 73.5 y 68.6 (citrato y leche, respectivamente) (Cuadros 2 y 3).

El cuadro 4, muestra los costos de los diluyentes. El diluyente a base de leche costó \$ 174.00 y el de citrato de sodio y ácido cítrico costó \$ 129.56. Estos costos son por 100 ml de diluyente, útiles para preparar de 400-500 pajillas, dependiendo de la concentración y el movimiento progresivo de los espermatozoides.

CUADRO # 1

FERTILIDAD DE LAS OVEJAS COMPARANDO SEMEN DILUIDO CON CITRATO DE SODIO Y ACIDO CITRICO Y OTRO DE LECHE U.P. MAS ANTIBIOTICOS.

	NUMERO DE OVEJAS INSEMINADAS	FERTILIDAD*	
		NUMERO	%
DILUYENTE LECHE MAS ANTIBIOTICOS	67	47	70.1
DILUYENTE CITRATO MAS ACIDO CITRICO	71	54	76.0
TOTAL	138	101	72.0

* POSITIVAS AL DIAGNOSTICO DE GESTACION POR ULTRASONIDO A LOS 60 DIAS.

(p > 0.05)

CUADRO # 2**FERTILIDAD DE LAS OVEJAS UTILIZANDO SEMEN FRESCO O REFRIGERADO DILUIDO CON CITRATO DE SODIO Y ACIDO CITRICO.**

	NUMERO DE OVEJAS INSEMINADAS	FERTILIDAD *	
		NUMERO	%
SEMEN FRESCO	37	29	78.3
SEMEN REFRIGERADO	34	25	73.5
TOTAL	71	54	76.0

* POSITIVAS AL DIAGNOSTICO DE GESTACION POR ULTRASONIDO A LOS 60 DIAS.

(P > 0.05)

CUADRO # 3**FERTILIDAD DE LAS OVEJAS UTILIZANDO SEMEN FRESCO O REFRIGERADO DILUIDO CON LECHE ULTRAPASTEURIZADA Y ANTIBIOTICOS.**

	NUMERO DE OVEJAS INSEMINADAS	FERTILIDAD *	
		NUMERO	%
SEMEN FRESCO	32	23	71.8
SEMEN REFRIGERADO	35	24	68.6
TOTAL	67	47	70.1

* POSITIVAS AL DIAGNOSTICO DE GESTACION POR ULTRASONIDO A LOS 60 DIAS.

(P > 0.05)

CUADRO # 4

COSTO DE LOS DILUYENTES

DILUYENTE LECHE

0.4 g. de penicilina.....	\$ 56.00
0.4 g. de estreptomocina.....	\$ 60.00
100 ml. de leche (U.P.).....	\$ 35.00
0.3 g. de sulfanilamida.....	\$ 23.00
	<u>174.00</u>

DILUYENTE CITRATO

2.8 g. de Citrato de Sodio.....	\$ 51.52
0.8 g. de Acido Citrico.....	\$ 31.04
100 ml. de Agua Bidestilada.....	\$ 47.00
	<u>129.56</u>

DISCUSION

Al utilizar el diluyente con citrato se obtuvo un porcentaje de fertilidad igual al del diluyente con leche. Esto sugiere que los fosfatos, glúcidos, prótidos y lípidos de la leche, así como los antibióticos no son constituyentes indispensables de los diluyentes del semen fresco de ovino, aún cuando éste se almacene por periodos no mayores de 8 hrs. a 15 C.

La mayoría de los resultados obtenidos en la inseminación artificial en ovinos a nivel mundial varían de 50-75% de fertilidad.

La fertilidad obtenida en este estudio iguala o mejora la obtenida en otros países. En Francia obtuvieron un 75% de fertilidad con un diluyente de leche y yema de huevo (8). En Australia obtuvieron un porcentaje de fertilidad de 70 % con diluyentes a base de citrato-yema-glucosa y otros a base de leche de vaca (4). Rusia han obtenido porcentajes de fertilidad de 73-75 cuando se inseminó con semen fresco y 60-65 % cuando se utilizó semen diluido con glucosa-citrato-yema de huevo almacenado a una temperatura de 15 C (10).

El diluyente de citrato, a diferencia de otros, al disminuir el pH. del semen reduce también el metabolismo de los espermatozoides, ocasionando que estos últimos no utilicen por completo los nutrientes que contiene el material seminal, cuando se insemina poco después de la obtención del semen o bien cuando se almacena por períodos no mayores de 8 hrs. a 15 (17).

En cuanto a los costos de los diluyentes, el de leche es más elevado que el de citrato, existiendo una diferencia de \$ 43.00 por 100 ml.

En relación a la preparación, el diluyente de citrato resultó ser más fácil de elaborar que el diluyente de leche. Otro inconveniente encontrado en el diluyente de leche U.P. es que requiere de refrigeración una vez abierto el envase.

Se concluye que tanto el diluyente de citrato como el de leche son buenos diluyentes del semen de ovino y dado que los porcentajes de fertilidad obtenidos en este trabajo son altos, se recomienda su utilización a nivel de campo.

LIBRERIA CIUDA

- 1.- Angeles, C. S. : Evaluación de la sensibilidad - efectividad del diagnóstico de gestación por la técnica de ultrasonido. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (1984)
- 2.- Bonadona, C. : Fisiología de la Reproducción, Ed. Salvat Editores, México, D.F. 1961
- 3.- Bustamante, C. G. : Evaluación del Semental. Memorias del Curso de Actualización. Aspectos de Producción Ovina. México, D.F., 1981. 116-122. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (1981).
- 4.- Colas, G. : Storage of Ram Semen. In: Sheep Breeding, Edited by: Jones, G & Robertson, 521-532 D. 2nd ed. Ed. Butterworths, England, London, 1979.
- 5.- Daniel, W. : Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 3a reimpresión. Ed. LIMUSA, México, D.F. 1982.
- 6.- Derivaux, J. : Reproducción de los Animales Domésticos. 2a. ed. Ed. Accibia. España, Zaragoza 1976.
- 7.- Durán, A. : Anatomía y Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay
- 8.- Firth, J. : Studies in Artificial Insemination fo Sheep in Western Australia. In: Sheep Breeding, Edited by Jones, G & Robertson, D. 547-553 2nd ed. Butterworths, England, London 1979.
- 9.- García, M. : Modificación del Sistema de Clasificación Climática de Koppen, 3a. ed. Offset Larioz, México D.F. 1981
- 10.- Jheltobrch, A. : Artificial Insemination of Sheep in the Soviet Union. In: Sheep Breeding. Edited by Jones, G. & Robertson, D. 565-569 2nd ed. Butterworths, England, London 1979.
- 11.- Makler, A. & Fisher, M. : A New Method for a Rapid Determination in Bull and Ram Semen. Theriogenology, 21: (4) 543-545 (1984).
- 12.- Maule, J. : The Semen of Animal and Artificial Insemination. Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. Inland, Farnham 1952.
- 13.- McDonald, L. : Reproducción y Endocrinología Veterinaria. 2a ed. Ed. Interamericana, México D.F. 1978.

14.- Ferry, J.: The Artificial Insemination of Farm Animals. 4th ed. Rutgers University Press, U.S.A., New Jersey 1978

15.- Ott, S. & Memon, A.: Sheep and Goat Manual. Society for Theriogenology, X Hastings, Nebraska, 1980.

16.- Salisbury, W.: Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en los Bovidos. Ed. ACCIBIS, España, Zaragoza 1964.

17.- Zlatarev, S.: Increased efficiency of A.I. of sheep in large scale sheep farms. Proceeding 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, University of Illinois, Urbana-Champaign, 1984, 384-385, I.C.A.R.A.I., U.S.A. Urbana-Champaign, (1984).