



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS LOMA BONITA

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

**EFFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO POST-EYACULACIÓN
SOBRE LA PROPORCIÓN DE SEXOS DE LAS CRIAS
OBTENIDAS POR INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CONEJOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ZOOTECNIA

PRESENTA:

CALIPSO CERQUEDA RÍOS

DIRECTOR: DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA

LOMA BONITA, OAXACA, MÉXICO, ENERO 2015.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

LA PRESENTE TESIS TITULADA “EFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO POST-EYACULACIÓN SOBRE LA PROPORCIÓN DE LAS CRÍAS OBTENIDAS POR INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CONEJOS”, PRESENTADA POR LA PASANTE **C. CALIPSO CERQUEDA RÍOS** BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA, HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL JURADO EXAMINADOR PARA SER OBTENIDA EN EL EXAMEN PROFESIONAL Y OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN ZOOTECNIA.

JURADO EXAMINADOR

DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA
DIRECTOR DE TESIS

M.C. VICTOR MANUEL MEZA VILLALVAZO
REVISOR

DR. JOSÉ ABAD ZAVALETA
REVISOR

DR. SERGIO RAMÍREZ ORDOÑEZ
REVISOR

LOMA BONITA, OAXACA, MÉXICO, ENERO 2015.

DEDICATORIA

A mis padres, Sebastián y Luz María por brindarme todo el apoyo para seguir adelante, por no permitirme desistir y por toda la confianza depositada en mí.

A mis hermanos por haber sido un claro ejemplo de perseverancia para lograr un objetivo y por darme un motivo para superar los obstáculos.

A mis sobrinos, por ser un motivo de alegría y por el amor tan grande que me brindan.

A ustedes, que han contribuido de gran manera a formar la mujer que soy ahora.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme regalarme la dicha de la vida.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación académica, gracias por los consejos que en su momento me brindaron y el ánimo que me transmitían, por eso y más gracias.

A mis amigos, To, Xo y Ne por su grata e invaluable compañía. Por todos los ratos tan agradables, los consejos, el apoyo moral y por esas palabras de ánimo que nunca estuvieron por demás. **A Toño** que soportó tanto. **A Xóchitl** que me transmitía su paciencia y a **Neme** por ese carisma que me contagiaba de alegría.

A mis compañeros y amigos, Nay, John y a Fredo por muchas cosas.

Al Dr. Alfredo Trejo, director de tesis **y revisores, Dr. Abad, Dr. Sergio y M.C. Meza** por los aportes que hicieron con sus revisiones.

A TI, por brindarme tu apoyo incondicional, tus consejos y tu tiempo pero sobre todo, por haber llegado a darle inmensa dicha a mi vida. Gracias por regalarme tan bellos momentos de alegría y respeto mutuo, *“gracias pro too lo vivido”*.

Gracias por ser TÚ. Gracias por dejarme ser YO

INDICE

INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	vii
ANEXOS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. HIPÓTESIS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Células sexuales masculinas	5
4.1.1. Espermatogénesis	5
4.1.1.1. Tipos de células en la espermatogénesis	8
4.1.2. Espermatozoide	9
4.1.2.1. Anatomía del espermatozoide	10
4.2. Estrés calórico	12
4.2.1. El estrés calórico y sus efectos en los espermatozoides	12
4.3. La proporción de sexos	13
4.3.1. Importancia de la proporción de sexos	13
4.3.2. Mecanismos para alterar la proporción de sexos	13
4.3.2.1. Mecanismos pre-fertilización	14
4.3.2.2. Mecanismos pos-fertilización	15

5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1. Localización	17
5.2. Animales	17
5.3. Experimento 1. Viabilidad y movilidad espermática en semen sometido a estrés calórico	17
5.3.1. Obtención de semen	17
5.3.2. Dilución de semen	18
5.3.3. Tratamiento de los eyaculados obtenidos	18
5.3.4. Movimiento en masa pre y pos-dilución	18
5.3.5. Viabilidad pre y pos-dilución	19
5.4. Experimento 2. Estrés calórico en los espermatozoides sobre la proporción de sexos de la camada	19
5.4.1. Inseminación artificial	19
5.5. Análisis estadístico	20
6. RESULTADOS	21
7. DISCUSIÓN	23
8. CONCLUSIÓN	25
9. LITERATURA CITADA	26

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Valores promedio de movilidad y viabilidad espermática antes de aplicar estrés calórico	21
Cuadro 2	Parámetros de movilidad y viabilidad en eyaculados después de aplicar estrés calórico	21
Cuadro 3	Resultados obtenidos de la inseminación artificial de conejas utilizando semen con y sin estrés calórico	22
Cuadro 4	Proporción de sexos	22

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación de los túbulos seminíferos en los testículos	5
Figura 2	Etapas de la espermatogénesis	7
Figura 3	Espermiogénesis del conejo	8
Figura 4	Composición anatómica del espermatozoide del conejo	10

ANEXOS

Anexo 1	Composición del alimento	32
---------	--------------------------------	----

ABREVIATURAS

- ATP: Adenosin Trifosfato.
- ECEC: Eyaculados Con Estrés Calórico.
- ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.
- ESEC: Eyaculados Sin Estrés Calórico.
- G₆DP: Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa.
- GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropina.
- IA: Inseminación Artificial.
- PMSG: Gonadotropina coriónica equina.
- ROS: Especies Oxígeno Reactivas (Reactive Oxygen Species).
- UI: Unidades Internacionales.

RESUMEN

La proporción de sexos de las crías en una población es la relación de número de machos con respecto al número de hembras. De manera natural esta relación es de 1:1. El poder alterar la proporción de sexos de las crías es de gran importancia para la producción animal, debido al valor económico que tienen los animales de un determinado sexo en los diferentes sistemas de producción. Existen varios mecanismos que son utilizados para alterar la proporción de sexos de las crías. Uno de estos mecanismos está relacionado con el estrés calórico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estrés calórico en la movilidad y viabilidad espermática y en la proporción de sexos de las crías. Se obtuvieron eyaculados (n=30) los cuales fueron sometidos a dos tratamientos, el eyaculado con estrés calórico (ECEC) en baño María a 42 °C por 30 min (n=15) y el eyaculado sin estrés calórico (ESEC) a 37 °C por 30 min (n=15). Diez conejas fueron inseminadas con semen procedentes del tratamiento ECEC y otras 10 conejas fueron inseminadas con el tratamiento ESEC. En cuanto a la movilidad y viabilidad espermática, en los dos tipos de eyaculados, con y sin estrés calórico se encontraron diferencias ($p < 0.05$). En relación con la proporción de sexos de las crías, se observa un aumento en la proporción de hembras obtenidas cuando se inseminó con semen sometido a un estrés calórico ($p < 0.05$).

Palabras clave: Semen de conejo, movilidad y viabilidad espermática, estrés calórico, proporción de sexos.

ABSTRACT

Sex ratio in animal populations refers to male:female numbers in the offspring. In nature sex ratio is 1:1 for many species. Changing litter sex ratio might bring an important advantage in animal production, because each sex has different economic value for a particular production system. Many technologies have been proposed in order to change sex ratio. One of the more important mechanisms is associated with thermal stress. The objective of the present assay was to evaluate how thermic stress affects spermatic mobility and motility in the semen and in litter sex ratio. Ejaculates were obtained (n=30) and assigned to one of two treatments, the first one with thermic stress (TE) in water bath at 42 °C during 30 min (n=15) and the second without thermic stress (WS) at 37 °C during 30 min (n=15). Ten does were then inseminated with the semen of each treatment (n₁=n₂=10). Thermic stress changed spermatic motility and mobility. Sex ratio was modified when semen was first treated with thermic stress, female odds were higher when does were inseminated with semen TE in contrast with semen WS (P<0.05).

Key words: Rabbit semen, spermatic mobility and motility, thermic stress sex ratio.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos del uso la biotecnología en área pecuaria es la obtención de crías de un sexo específico (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). La obtención de crías de un sexo determinado es de gran importancia para la producción animal, por ejemplo en un sistema productor de carne los machos son más apreciados que las hembras, mientras que en un sistema productor de leche las hembras son más apreciadas que los machos (Suarez, 2007). Los mecanismos causantes de una alteración en la proporción de sexos se han agrupado en función al momento de ocurrencia de dicha alteración; es decir, antes o después del momento de la fecundación. De acuerdo con esto, los métodos se agrupan en mecanismos pre y pos-fertilización respectivamente. Uno de los mecanismos pre-fertilización que altera la proporción de sexos es la inseminación utilizando semen sexado. Para ello se utiliza una muestra de semen enriquecida con espermatozoides portadores del cromosoma X o Y. Por otra parte, hay estudios que muestran un efecto del estrés calórico (temperaturas elevadas) en varios aspectos de la reproducción (Correa-Calderón, 2012; Hansen, 2009). El estrés térmico tanto ambiental como aquel aplicado localmente sobre el escroto, tiene un impacto negativo sobre la calidad espermática (Banks *et al.*, 2005; Lue *et al.*, 2000; Mieusset *et al.*, 1987; Mieusset *et al.*, 1992; Skinner y Louw, 1966).

Gomendio *et al.* (2006) sugiere que en el ciervo (*Cervus elaphus*), existe una relación entre la calidad espermática, la fertilidad del macho y la proporción de sexos en su descendencia.

Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado para tratar de establecer un efecto de la temperatura sobre la proporción de sexos a través de un mecanismo pre-fertilización. El objetivo de este trabajo fue establecer los efectos del estrés calórico de 42 °C/30 min aplicado a los espermatozoides antes de la inseminación afecta de manera significativa los espermatozoides portadores del cromosoma Y o X, provocando una alteración en la proporción de sexos de la descendencia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés calórico en el semen de conejo sobre la movilidad y viabilidad espermática post-eyaculación y sobre la proporción de sexos de las crías obtenidas por inseminación artificial.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto del estrés calórico en el semen de conejo sobre la movilidad y viabilidad espermática.
- Establecer la proporción de sexos en las camadas de conejas inseminadas con semen CON y SIN estrés calórico.

3. HIPÓTESIS

La aplicación del estrés calórico post-eyaculación tendrá un efecto negativo sobre los espermatozoides portadores del cromosoma Y, favoreciendo el nacimiento de hembras.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1. Células sexuales masculinas

4.1.1. Espermatogénesis.

Se llama así al proceso de formación de los espermatozoides, ocurre en los túbulos seminíferos que se encuentran en los testículos (Figura 1), para que se lleve a cabo el proceso es necesario la presencia de ciertas hormonas, siendo las principales la FSH, LH y Testosterona (Urbina, 2008). Inicia durante el periodo de la pubertad, tiene una duración variable dependiendo de la especie y en el caso de los conejos dura de 42 a 52 días (González, 2004; Caravaca *et al.*, 2003).

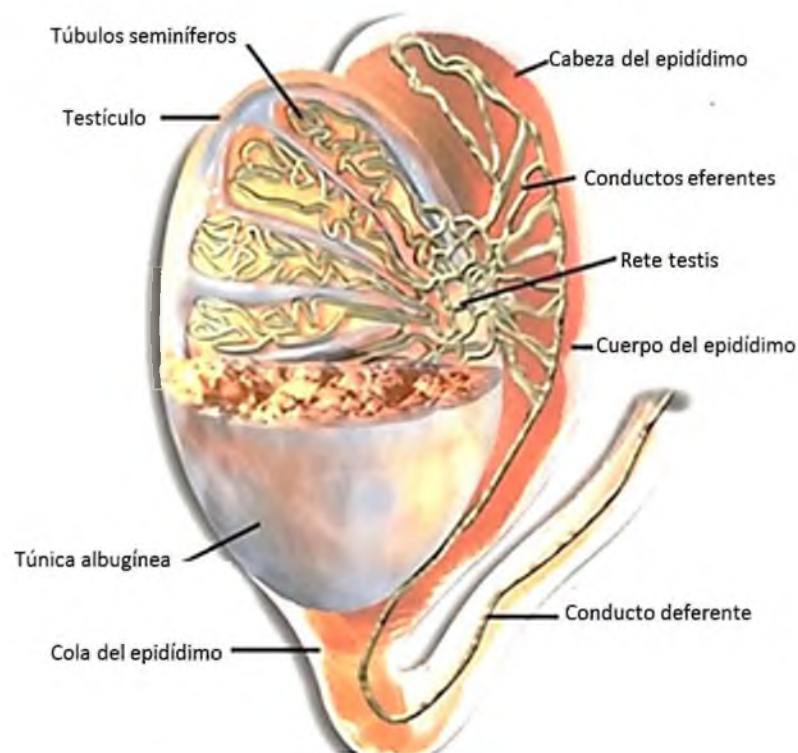


Figura 1. Ubicación de los túbulos seminíferos en los testículos (Tomado de EME Histología).

La espermatogénesis está dividida en 4 fases (Figura 2) que se describen a continuación:

a) Fase mitótica o proliferativa: Es la fase en la que las células primordiales germinales migran a los túbulos seminíferos, sitio donde ocurre la división mitótica que da origen a los gonocitos que a su vez darán origen a las espermatogonias.

b) Fase de crecimiento: En esta fase las espermatogonias fetales que son originadas de la fase mitótica dan origen a los espermatocitos primarios diploides (2n).

c) Fase de división meiótica o de maduración: Los espermatocitos primarios sufren una primera división meiótica dando origen a los espermatocitos de segundo orden. Los espermatocitos de segundo orden sufren una segunda división meiótica dando origen a las espermátidas.

d) Fase de diferenciación o espermiogénesis: En este proceso las espermátidas sufren una serie de cambios funcionales y estructurales que dan por resultado la diferenciación de estas células a los espermatozoides (Hunter *et al.*, 2012; Kretser *et al.*, 1998).

Los principales cambios que ocurren durante la espermiogénesis (figura 3) son:

a) Formación del acrosoma. También llamada vesícula acrosómica, se forma por la fusión de otras vesículas proveniente del aparato de Golgi, esta vesícula contiene una gran cantidad de enzimas proteasas y las enzimas necesarias para poder entrar a la zona pelúcida durante la fecundación (Alba, 1964).

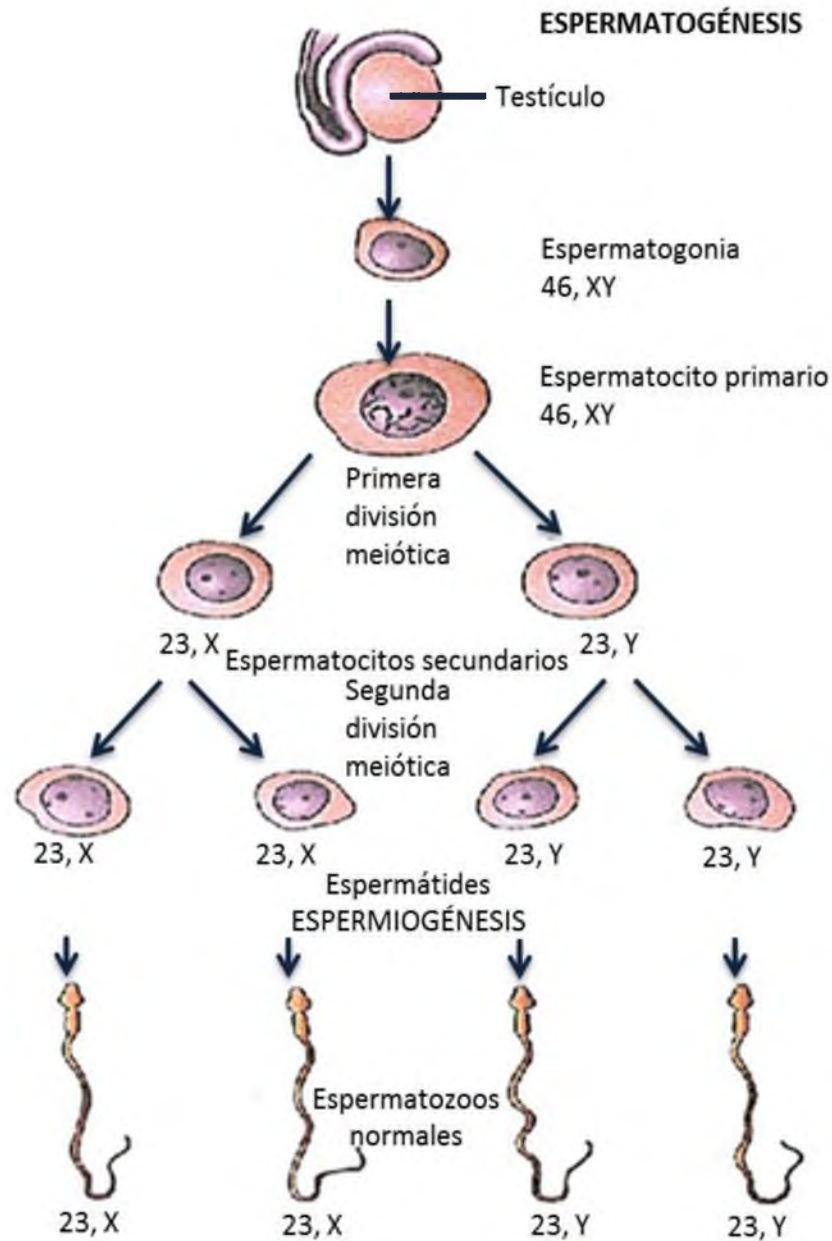


Figura 2. Etapas de la espermatogénesis (Tomado de Moore *et al.*, 2013).

b) Formación del flagelo. El centrosoma se mueve hacia el acrosoma para unirse con uno de los centriolos formando el axonema del flagelo. Alrededor de este axonema se forman unas fibras que llegan al cuello del espermatozoide hasta el tercio más distal del flagelo. Las mitocondrias que están en la espermátida sufren una migración, colocándose en el axonema flagelar y las

fibras de forma helicoidal formando la pieza intermedia del espermatozoide (Hunter *et al.*, 2012)

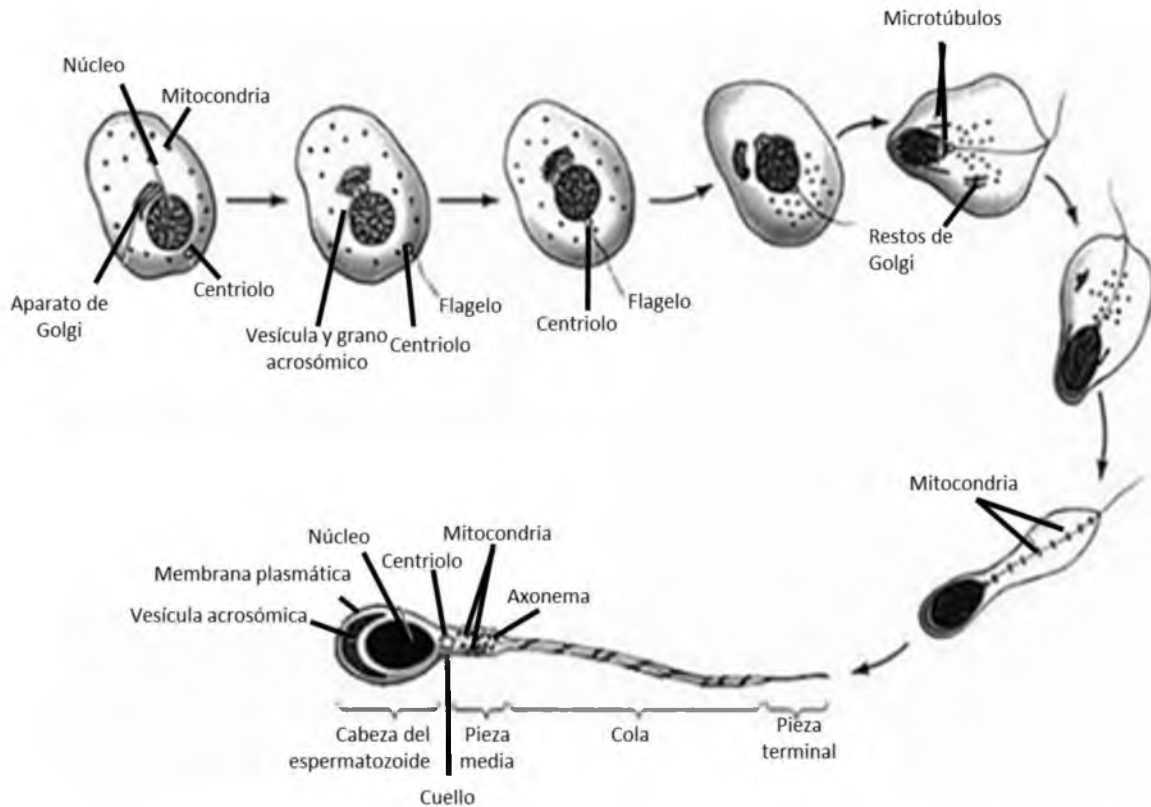


Figura 3. Espermiogénesis del conejo (Tomado de Gilbert, 2005).

4.1.1.1. Tipos de células de la espermatogénesis.

a) Espermatogonias. Las espermatogonias son las células a partir de las cuales se originan los espermatozoides por lo que son consideradas como la base de la espermatogénesis, en los roedores representan solo el 0.03 % de las células presentes en el testículo (Rooij, 1997). Existen dos tipos de espermatogonias las tipos A y B. Las espermatogonias tipo A sufren un proceso de división mitótica dando origen a las espermatogonias tipo B, por lo que son consideradas como células madre de las espermatogonias tipo B.

Las espermatogonias tipo B son las únicas que se van a diferenciar en los espermatocitos (Moore *et al.*, 2013).

b) Espermatocitos. Los espermatocitos son células características de la fase de maduración de la espermatogénesis (Figura 2). El espermatocito se denomina primario antes del inicio de la primera división meiótica y secundario después de completar ésta, pero antes de comenzar la segunda división meiótica. También se les conoce como células madre de los espermatozoides. Estas células tienen un número haploide de cromosomas. Los espermatocitos secundarios darán origen a las espermátidas (Moore *et al.*, 2013).

c) Espermátidas. Las espermátidas son las células que terminan en la fase de maduración y a través de la espermiogénesis se desarrollan en espermatozoides. Son células pequeñas haploides. Algunas características de las espermátidas son: una mayor cantidad de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias abundantes y un complejo de Golgi bien desarrollado (Moore *et al.*, 2013).

4.1.2. Espermatozoide.

Los espermatozoides son las células sexuales producidas por los individuos de sexo masculino. Estas células sexuales cuentan con la mitad de los cromosomas por eso se dice que son haploides (n) (Rogers, 2011).

El espermatozoide de conejo presenta una forma redondeada, tiene un largo total de 54.4 micras. La capacidad fecundante de un espermatozoide de

conejo es de 30 horas y su velocidad de desplazamiento es de 20 a 35 micras por segundo (Rodríguez, 1998).

4.1.2.1. Anatomía del espermatozoide.

Anatómicamente el espermatozoide se compone de una cabeza y cola o flagelo, esta ultima se divide en: cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza final (Figura 4):

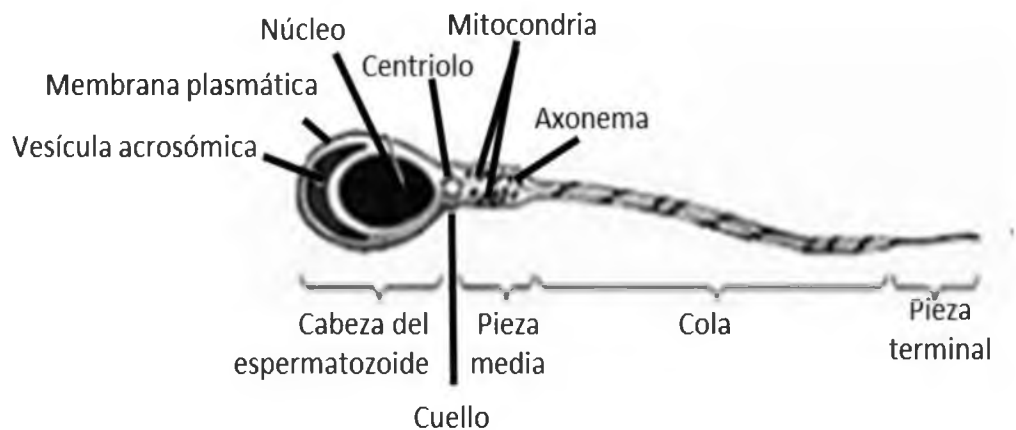


Figura 4. Composición anatómica del espermatozoide del conejo (Tomado Scott F. Gilbert, 2003).

a) La cabeza: La forma de la cabeza depende de la especie, en esta estructura se encuentra el núcleo que contiene el material genético. Otra estructura que forma parte de la cabeza es el acrosoma, que rodea parcialmente la cara anterior del núcleo. El acrosoma entra en contacto con la membrana celular anterior del espermatozoide y almacena varias enzimas: neuroaminidasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida, arilsulfatasa y acrosina, enzimas que son utilizadas para la degradación de la zona pelúcida durante la fertilización.

b) Cuello: Es corto y estrecho contiene una placa basal que lo separa de la cabeza y de los centriolos modificados, de uno de los centriolos se origina el flagelo.

c) La cola: Es alargada y presenta pieza media, pieza principal y pieza final. La pieza media comienza con el primero de los anillos incompletos de los cuerpos densos y termina en un annulus o anillo de Hensen pequeño. El axonema se forma por nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central.

El miembro externo de los dobletes periféricos no cierra completamente y envía prolongaciones en forma lineal hacia el miembro cerrado del par adyacente.

En la pieza final sólo aparece el axonema rodeado de la membrana plasmática y el patrón de micro-túbulos 9+2 del axonema se pierde (Smith *et al.*, 1992).

- ✓ Pieza intermedia: Posee una gran cantidad de mitocondrias, que proveen de energía al espermatozoide produciendo adenosina trifosfato (ATP) (Welsch, 2008).
- ✓ Pieza principal: Es el segmento más largo de la cola, se extiende desde el anillo hasta la pieza final. El axonema está rodeado por las siete fibras externas, la pieza principal disminuye de grosor cerca de la extensión caudal, sitio en el que terminan las fibras externas y la capa fibrosa, y se continúa con la pieza terminal (Welsch, 2008).
- ✓ Pieza terminal: Está constituida por el axonema central rodeado por el plasmalema. El axonema se desorganiza en los últimos 0.5 a 1 μm , por

lo que en lugar de 9 dupletes, hay 20 micro-túbulos individuales distribuidos al azar (Welsch, 2008).

4.2. Estrés calórico

Se considera un estrés calórico cuando la temperatura ambiental corporal de un organismo está por arriba del límite superior de su zona termoneutral o de confort (un ejemplo de estrés calórico es de 42 °C) (Rivier y Rivest, 1991).

4.2.1. El estrés calórico y sus efectos en los espermatozoides.

Cuando la temperatura escrotal se incrementa, lo que genera alteraciones en la espermatogénesis que afectan tanto al número de espermatozoides como su viabilidad y motilidad. Así como la integridad del ADN de los espermatozoides y en consecuencia la fertilidad de los machos disminuye (Banks *et al.*, 2005; Love y Kenney, 1999).

El mecanismo a través del cual el estrés calórico afecta la movilidad espermática es complejo, sin embargo se ha establecido que cuando los espermatozoides son sometidos a una temperatura elevada se lleva a cabo una producción excesiva de especies oxígeno reactivas o ROS, proceso que da lugar a un estrés oxidativo en las células germinales (Tortolero *et al.*, 2005). Los ROS afectan la capacidad fertilizante de los espermatozoides debido a las alteraciones que se producen en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo cual se traduce en alteraciones en la movilidad y morfología del espermatozoide (Zalata *et al.*, 2004). Es posible que en el corto tiempo de

incubación pre-incubación de los espermatozoides (30 min), la producción de ROS llegue a causar un estrés oxidativo y por lo tanto afectar de manera significativa la movilidad y la viabilidad espermática.

4.3. La proporción en sexos

Pérez (2008) menciona que se entiende por proporción de sexos de la descendencia, la relación entre la proporción de machos y hembras. Se considera que existe una alteración de la proporción de sexos en la descendencia cuando existe una diferencia significativa respecto a la proporción esperada (1:1).

4.3.1. Importancia de la proporción de sexos.

Uno de los principales objetivos de las técnicas de biotecnología animal es la obtención de descendientes de un determinado sexo (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011) debido a su gran importancia en la producción animal. La producción ganadera bovina es un claro exponente de ello. En el caso del ganado de carne y en los centros de producción de animales para esquemas de selección se prefiere una descendencia masculina, mientras que en animales destinados para producción láctea, se persigue tener una descendencia de sexo femenino (Suarez, 2007).

4.3.2. Mecanismos para alterar la proporción de sexos.

Existen dos sistemas para manipular la proporción del sexo, el primero es la determinación del sexo en biopsias embrionarias, y el segundo a través de la separación de espermatozoides portadores de cromosoma X o Y.

Los mecanismos causantes de una alteración en la proporción de sexos se han agrupado dependiendo de si éstos ocurren antes o después del momento de la fecundación, es decir mecanismos pre y pos-fertilización (Pérez, 2008).

4.3.2.1. Mecanismos pre-fertilización.

Hay dos teorías principales sobre la manipulación de la proporción de sexo en mamíferos antes de la fecundación, como es: la teoría hormonal y la teoría de los diferentes espermatozoides portadores de cualquiera de los cromosomas X o Y.

Se dice que los niveles hormonales de las hembras durante el ciclo estral pueden seleccionar a los espermatozoides con cromosomas X o Y (Pérez, 2008).

Grant (2007) menciona que cuando los niveles de la progesterona son modificados atraen a los espermatozoides portadores con cromosomas X, en el caso de los niveles de la progesterona afecta el tránsito de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización, de tal forma que la fecundación en el momento de la ovulación produciría un mayor número de hembras y la fecundación antes o después de la ovulación produciría un mayor número de machos.

Por otro lado cuando es monta natural, la proporción de sexos en las crías es 50 % machos y 50 % hembras (Camargo, 2012; Van *et al.*, 1998), aunque cuando se utiliza súper-ovulación y transferencia de embriones, hay una mayor proporción de machos atribuidos a factores relacionados con el grado de desarrollo y calidad de los embriones transferidos (Van *et al.*, 1998).

Se sabe que varios son los factores que influyen sobre los niveles hormonales afectando la proporción de sexos. Los factores pueden ser toxicológicos, cancerígenos, oncológicos, entre otros (James, 2001). Incluso la interacción del espermatozoide con el ovocito podría llegar a distorsionar la proporción de sexos (Kochhar *et al.*, 2003).

4.3.2.2. Mecanismos pos-fertilización.

Existe una variedad de contaminantes ambientales, factores fisiológicos y estresantes que influyen en la proporción de sexos en los mamíferos.

Se ha propuesto un mecanismo que relaciona contaminantes ambientales, factores fisiológicos y estresantes. Este mecanismo asume que los factores externos pueden afectar la dinámica de apareamientos o bien el desarrollo uterino. Estos efectos pueden alterar la sincronía entre el útero y los blastocistos (momento en que los embriones están preparados para implantarse).

Lo anterior permite asumir que los embriones que se encuentran en un estadio más avanzado o más retrasado del desarrollo son los que tienen una menor tasa de implantación, y los embriones con un desarrollo sincronizado con el útero son los que más probabilidades tienen de implantarse (Pérez, 2008).

Existe una teoría que se denomina “teoría de la sincronía en el desarrollo” (Krackow, 1995). En base a esta teoría, se ha publicado que los embriones preimplantacionales de sexo masculino se desarrollan más rápido que los de sexo femenino (Gutierrez-Adan *et al.*, 2005; Pergament *et al.*, 1994).

De esta forma si la sincronía uterina favorece al desarrollo rápido de los embriones que están codificados con el cromosoma Y predominarán los machos en la descendencia, y por el contrario si la sincronía uterina favorece al desarrollo lento de los embriones que están codificados con el cromosoma X predominarán hembras.

Sin embargo James (2001) propone que la inducción de estrés oxidativo y la apoptosis en los estadios embrionarios del desarrollo pre-implantación pueden ser una de las razones por las que se producen una distorsión de la proporción de sexos de la descendencia tras la exposición a agentes tóxicos y estresantes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

El presente trabajo se realizó en los meses de marzo a junio, en la unidad animal “La Posta” de la Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita en el estado de Oaxaca, con coordenadas de 18° 06´ 09” latitud Norte y 95° 53´ 34” longitud Oeste, a una altitud de 28 msnm. El clima del lugar es cálido húmedo con lluvias abundantes en verano. La temperatura y precipitación anual promedio son de 25 °C y 1,845 mm respectivamente (García, 2004).

5.2. Animales

Se utilizaron 20 hembras y 4 machos de la raza Nueva Zelanda de 4-5 meses de edad. Fueron alimentados con Conejina N Purina® (Anexo 1) y agua a libre acceso.

5.3. **Experimento 1.** Viabilidad y movilidad del semen de conejo sometido a estrés calórico

5.3.1. Obtención de semen.

La eyaculados se obtuvieron mediante la utilización de una vagina artificial a una temperatura promedio de 49 °C y tubos colectores de plástico graduados, técnica propuesta por Hernández *et al.* (2008).

5.3.2. Dilución del semen.

La preparación del diluyente a base de agua de coco (*Cocos nucifera*) se realizó mediante la técnica propuesta por Nunes y Fernández (2001). El agua de coco una vez obtenida fue filtrada (papel filtro # 42) y almacenada (5 °C) en frascos estériles hasta su uso. El semen fue diluido en una proporción de 1:1 con agua de coco. Los cocos fueron obtenidos de las áreas verdes de la Universidad del Papaloapan - *Campus* Loma Bonita, tomando en cuenta una muestra representativa y homogénea.

5.3.3. Tratamiento de los eyaculados obtenidos.

Para evaluar el efecto del estrés calórico en la movilidad y viabilidad espermática, 30 eyaculados fueron divididos en dos grupos: un grupo (n= 15) fue sometido a estrés calórico en baño María a 42 °C/30 min; otro grupo (n= 15) fue mantenido a temperatura ambiente a 37 °C/30 min. En ambos grupos se realizó una evaluación pos-tratamiento tanto de la movilidad como de la viabilidad.

5.3.4. Movimiento en masa pre y pos-dilución.

La determinación de la movilidad antes y después de la dilución se realizó de la siguiente manera, la muestra fue diluida en una proporción 1:1, hasta obtener 10 a 20 espermatozoides por campo, después se observó bajo el microscopio a 40X un total de 100 espermatozoides registrando el porcentaje de móviles e inmóviles.

5.3.5. Viabilidad pre y pos-dilución.

La determinación de la viabilidad antes y después de la dilución se realizó de la siguiente manera: se colocaron 5 μ L de muestra, en un portaobjetos y 5 μ L de una solución de Eosina (1 %) y Nigrosina (5 %), se realizó una homogenización y posterior secado (platina térmica), finalmente se observó en el microscopio a 40X contando 100 espermatozoides registrando el porcentaje de vivos y muertos.

5.4. **Experimento 2.** Estrés calórico en los espermatozoides sobre la proporción de sexos de la camada.

Las muestras diluidas se dividieron en dos tratamientos: la mitad de los eyaculados se sometieron a un estrés calórico (42 °C/30 min) y la otra mitad se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. Ambos grupos de eyaculados fueron utilizados para la inseminación de conejas.

5.4.1. Inseminación artificial.

La IA se realizó siguiendo la técnica propuesta por Morrell (1995), las hembras fueron sincronizadas utilizando 40 UI de PMSG (Folligon, Intervet®) 48 h antes de la inseminación. Las hembras fueron divididas en dos grupos: un grupo (n= 10) se inseminó utilizando semen sometido a estrés calórico y el otro grupo (n= 10) de hembras fue inseminadas con el semen sin estrés calórico.

Para la inseminación se utilizó una cánula con un extremo curvado y en el otro extremo acoplado a una jeringa de insulina (1 mL). El tamaño

aproximado es de 23 cm. La jeringa se cargó con 1 mL de semen diluido. La cánula se introduce a la vagina por el lado curvado y se realiza el depósito del semen. Se retiró la cánula y se aplican 0.2 mL de GnRH (Fertagyl, Intervet®). Se determinó el tiempo de gestación así como el número de gazapos por camada al momento del parto y el sexo de los mismos.

5.5. Análisis estadístico

En el Experimento 1 se aplicó una prueba t de Student ($p < 0.05$) para comparar la viabilidad y movilidad del semen CON y SIN estrés calórico.

En el Experimento 2 se aplicó una prueba t de Student para comparar el número de gazapos por camada en hembras inseminadas con semen CON vs SIN estrés calórico, se utilizó una ji-cuadrada para comparar la proporción hembra/macho de la condición normal vs la condición de los tratamientos.

6. RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los valores promedio para las características de los eyaculados en fresco obtenidos mediante la vagina artificial.

Cuadro 1. Valores promedio de movilidad y viabilidad espermática antes de aplicar estrés calórico.

Número de eyaculados (n)	Volumen (mL±EE)	Movilidad (%)	Viabilidad (%)
30	0.83±0.04	87.3±1.18	89.4±0.33

Experimento 1. Viabilidad y movilidad espermática en semen sometido a estrés calórico. En el Cuadro 2 se muestran los promedios obtenidos en cuanto a la movilidad y viabilidad espermática en los dos tipos de eyaculados, con y sin estrés calórico. Como puede observarse hay diferencias significativas ($p>0.05$) en cuanto a los parámetros evaluados.

Cuadro 2. Parámetros de movilidad y viabilidad en eyaculados después de aplicar estrés calórico

Parámetro	Movilidad (%)	Viabilidad (%)
Eyaculados CON estrés calórico (±EE)	88.2±0.16 ^a	75.5±0.22 ^b
Eyaculados SIN estrés calórico (±EE)	87.1±0.18 ^b	89.0±0.17 ^a

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia ($p<0.05$)
EE, error estándar.

Experimento 2. Estrés calórico en los espermatozoides sobre la proporción de sexos de la camada. En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos al realizar la Inseminación artificial de conejas utilizando eyaculados con y sin estrés calórico. Se observa un efecto significativo ($p<0.05$) en el número de gazapos por camada cuando se insemina con semen con estrés calórico. En

cuanto a la duración de la gestación no se observaron efectos del estrés calórico. En relación con la proporción de sexos de las crías, se observa un efecto significativo ($p < 0.05$) en el número de hembras obtenidas cuando se inseminó con semen sometido a un estrés calórico.

Cuadro 3. Resultados obtenidos de la inseminación artificial de conejas utilizando semen con estrés y sin estrés calórico.

Tratamiento	Número de hembras	Número de gazapos/ camada(\pm EE)	Duración de la gestación (días)
Eyaculados CON estrés calórico	10	6.38 ^b \pm 0.32	30.5
Eyaculados SIN estrés calórico	10	7.83 ^a \pm 0.45	30.0

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia ($p < 0.05$) EE, error estándar.

El aplicar estrés térmico al semen modifica la proporción de hembras y machos de 1:1 a 1.3:1 ($\chi^2=7.9$, $P < 0.01$), con respecto a la condición normal. La condición climática natural NO modifica la proporción natural de hembras y machos de 1:1 a 1.11:1 ($\chi^2=2.72$, $P=0.099$), como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Proporción de sexos.

Condición	Hembras	Machos
Normal	50	50
Eyaculados CON estrés calórico	36	28
Eyaculados SIN estrés calórico	41	37

7. DISCUSIÓN

El volumen promedio de los eyaculados fue de 0.83 mL, lo cual está dentro del rango reportado como normal por otros investigadores 0.3-1.0 mL (Alvariño, 1993). La movilidad progresiva en los eyaculados frescos fue de 87.3 %, superior a lo reportado por Mathur *et al.* (1998) y Hernández *et al.* (2008) quienes reportan 63.4 y 82.72 % de movilidad evaluada con una platina a 37 °C, respectivamente en eyaculados de conejo. Alvariño (1993) determinó que un eyaculado de buena calidad debe tener una movilidad de 60 a 70 %. El porcentaje de espermatozoides vivos en los eyaculados frescos fue de 89.4 %, similar a lo reportado por Hernández *et al.* (2008) con un 90.90 % y superior a lo reportado por Mathur *et al.* (1993) que fue de 70.9 % al trabajar semen fresco de conejo.

El efecto que tiene el estrés calórico sobre la movilidad y viabilidad espermática ha sido ampliamente estudiado, sin embargo los resultados han sido poco contundentes, Okab (2007) reportó que las condiciones de verano (32 °C y 89.5 % de humedad relativa) no tiene un efecto significativo en la movilidad de los espermatozoides. En este trabajo se obtuvo una movilidad y viabilidad pos-incubación de 88.2 % y 75.5 %, respectivamente superior a lo reportado por Burfening y Ulberg (1968) quienes encontraron un efecto significativo en la movilidad y viabilidad (39.54 % y 62.75 %, respectivamente) cuando los espermatozoides fueron incubados a 40 °C durante 3 h, esta diferencia podría deberse al tiempo de incubación utilizado en ambos trabajos (3 h vs 30 min).

El número de gazapos por camada está dentro de los parámetros para la raza Nueva Zelanda (Vásquez *et al.*, 2007). Se obtuvo un promedio de 7.83 gazapos cuando se utilizaron eyaculados sin estrés calórico, este valor es superior a lo reportado por Lavara *et al.* (2005) y Ponce de León *et al.* (2003) quienes obtuvieron 7.4 gazapos por camada (raza sintética) y 6.08 gazapos por camada (raza Nueva Zelanda), respectivamente. Por otra parte, al realizar la inseminación artificial utilizando los eyaculados con estrés calórico se observó una disminución significativa en el tamaño de la camada (6.38 gazapos por camada).

En este trabajo no se evaluó el daño causado por el estrés térmico en el ADN. No obstante, algunos autores han propuesto que el estrés térmico daña el material genético en el espermatozoide (Koefoed-Johnson *et al.*, 1971; Pérez-Crespo *et al.*, 2008; Hansen, 2009), pese a que no afecta la movilidad espermática, viéndose afectada la viabilidad de los embriones. Esto traería como consecuencia una disminución en el número de gazapos obtenidos con semen sometido a estrés calórico.

En relación con la proporción de sexos de las crías, Pérez-Crespo *et al.* (2008) reportaron que los espermatozoides X son más resistentes al estrés calórico debido a la presencia de enzimas ligadas al cromosoma X, como la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G₆PD), enzima que está relacionada con la protección contra el estrés oxidativo, es posible que esta diferencia entre espermatozoides portadores del cromosoma X o Y sea la causa de la diferencia entre sexos de las crías obtenidas en este trabajo.

8. CONCLUSIÓN

La incubación del semen de conejo por 30 minutos a 42 °C modifica la movilidad y viabilidad espermática.

El someter el semen de conejo a estrés calórico reduce el tamaño de camada.

El semen sometido a estrés calórico aumenta la proporción de hembras en la camada en conejos.

9. LITERATURA CITADA

- Alba, D. J. 1964. Funcionamiento del sistema reproductivo en el macho. Reproducción y Genética Animal. Instituto Americano de Ciencias de la O.E.A. Turrialba, Costa Rica. 1(16) 28-43.
- Alvariño, M.R. 1993. Control de la reproducción en el conejo. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España, pp 65-88.
- Banks, S., King, S.A., Irvine, D.S., Saunders, P.T., 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction: The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 129:505-514.
- Barbado, J.L. 2003. Peso al nacer y Proporción de sexo. Cría de Conejos, su Empresa de Cunicultura. Albatros, Buenos Aires, pp 80-81.
- Burfening, P.J.; Ulberg, L.C., 1968. Embryonic survival subsequent to culture of rabbit spermatozoa at 38° and 40°C. *Reproduction: The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 129:505-514.
- Camargo, O. 2012. Dimorfismo sexual y desviación de la proporción de sexos en embriones preimplantatorios, *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 7(1): 105.
- Caravaca, R, F.P., Castel, G, J.M., Guzmán, G, J.L., Delgado, Pertíñez, M., Mena, G, Y., Alcalde, A, M.J., González, R, P. Bases de la Producción Animal. 2003. Universidad de Sevilla. Manuales Universitarios. 511(2):74-75.
- Correa-Calderón. A., Santos, G., Avendaño, L., Rivera, F., Alvarez, D., Ardon, F., Diaz, R., Collier, R. Enfriamiento artificial y tasa de concepción de vaquillas Holstein con estrés térmico. 2009. *Archivos de Zootecnia*. 222: 58(7): 232:238.
- EME Histología. Aparato genital masculino y femenino. 2011. Disponible en: <http://emecolombia.foroactivo.com/t1519-aparato-genital-masculino-y->

femenino-rosa-da-medicina-iiib-102102075. Fecha de consulta 15/10/2014.

Fertilab, fundada en 1974. La primera unidad de reproducción humana de Venezuela. Escroto y los Testiculos. Disponible en: http://www.fertilab.net/ver_impresion.aspx?id_articulo=256. Fecha de consulta 07/08/2014.

García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 5ª ed. universidad Autónoma de México. México, D.F. 90 p.

Gasque, R, G. Mejoramiento genético en bovinos. Enciclopedia Bovina, 2008. UNAM. 433 (2): 269-270.

Gilbert, S. F. 2005. Estructura de los gametos. Biología del Desarrollo. Buenos Aires: Médica Panamericana. 7 (1): 199.

Gomendio, M., Malo, A.F., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Estesó, M.C., García, A.J., Roldan, E.R., Garde, J. 2006. Male Fertility and Sex Ratio at Birth in Red Deer. *Science*. 1. 5804:314(3):1445-7.

González, R. M. Reproducción y Genética, 2004. Cunicultura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Área Interdisciplinaria de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Zootecnia. Disponible en: www.uabcs.com.

Grant, V.J. 2007. Could maternal testosterone levels govern mammalian sex ratio deviations? *Journal of Theoretical Biology* 246:708-719.

Guierrez - Adan, A. 2005. The epigenetic environment: secondary sex ration depends on differential survival in embryogenesis: comment 1. *Human reproduction* 20(9): 2662-3.

Hansen, P.J. 2009. Effect of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans. R. Soc. B Biol Sci.* 364:3341-3350.

- Hernández, P, J.E., Fernandez, R.F., Reyes, C.J., Cerezo, P.G., Echegaray JL., Mendoza, B. 2008. Separación de espermatozoides “Y” de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albumina sérica humana. *Revista de salud animal* 30(1):45-49.
- Hunter, D., Anand-Ivell, R., Danner, S., Ivell, R. 2012. Models of in vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1(1):32-43.
- Instituto Nacional de Estadística y Geográfica (INEGI). 2011. Carta hidrológica y climáticas del estado de Oaxaca.
- James, W.H. 2001. Sex ratio at birth, latitude. *J Epidemiol community health* 55:216
- Kochhar, H., Kochhar, K., Basrur, P., King, W. 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Animal reproduction science* 77:33-49.
- Koefoed-Johnson, H.H., Pavlok, A., Fulka, J. 1971. The influence of the ageing of rabbit spermatozoa in vitro on fertilizing capacity and embryonic mortality. *J. Reprod. Fert* 26:351-358.
- Krackow, S. 1995. The developmental asynchrony hypothesis for sex ratio manipulation. *Journal of Theoretical Biology* 176:273-280.
- Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N. 1998. spermatogenesis. *Human Reproduction* 13 (suppl 1):1-8.
- Lavara, R., Moce, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on farm inseminations in rabbit? *15; 64(5):1130-41.*
- Love, C.C., Kenney, R.M. 1999. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod.* 60:615-20.

- Lue, Y., Hikim, A.P., Wang, C., Im, M., Leung, A., Swerdloff, R.S. 2000. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the "two-hit" approach to male contraceptive development. *Endocrinology*. 141:1414-24.
- Mathur, A.K., Srivastava, R.S., Anil, J. 1998. Effect of pH and temperature on in vitro preservability of rabbit semen. *Indian Journal of Animal Science*, vol. 62 p. 144-146.
- McDonald, L.E. 1969. *Veterinaria Endocrina y Reproducción*, Philadelphia 460p.
- Mieusset, R., Bujan, L., Mondinat, C., Mansat, A., Pontonnier, F., Grandjean, H. 1987. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril*. 48:1006-11.
- Mieusset, R., Quintana-Casares, P., Sanchez-Partida, L.G., Sowerbutts, S.F., Zupp, J.L., Setchell, B.P. 1992. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Reprod Fertil*. 94:337-43.
- Moore, L.K., Persaud, T, V.N. y Torchia, M.G. 2013. Gametogenesis. *Embriología clínica*. 6(1): 15.
- Morrell, J.M. 1995 Artificial insemination rabbit. *Br Vet J*. 151(5):477-88.
- Nilani K, Eswaramohan T and Balasubramaniam K. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 2, Issue 12, December 2012.
- Nunes, J.F. y Fernández, D, R.F. 2001. *Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina*. Editorial Fortaleza. Ceará, Brasil. 105 pp.
- Okab, A. B. 2007. Semen characteristics and plasma testosterone of new zeland male rabbits as affected by environmental temperatures *Slovak J. Anim. Sci.*, 40, 2007 (4):161 – 167.

- Parra-Bracamonte, G.M., Fuente, R.A.M., De la Rosa R.X.F., Arellano, V.W. 2011 Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. *Tropical subtropical agroecosystem* 14(3).
- Perez-Crespo, M., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A. 2008. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 40–47.
- Pergament, E., Fiddler, M., Cho, N., Johnson, D., Holmgren, W.J. 1994. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod.* 9:1730-2.
- Ponce de León, R., Guzmán, G., Quezada, M.E., Mora, M., Flebes, M. 2003. Reproduccion comparativa de razas puras de conejos en condiciones comerciales. *Revista cubana de ciencia agrícola* 37(4):343-351.
- Rivier, C., Rivest, S. 1991. Effect of stress on the activity of hypothalamic-pituitary –gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.*, 45:523-532.
- Rodríguez de L. R. 1998. Anatomía y fisiología de la reproducción en el conejo. Universidad Autónoma de Chapingo. Depto. de Zootecnia. México. p. 10-61
- Rogers. Kara, 2011. Reproduction and pregnancy, En: the reproductive system, Edition, Britannica, Nueva York, pág. 89.
- Rooij, D.G., Dissel-Emiliani, F, M.F. 1997. Regulation of proliferation and differentiation of stem cells in the male germ line. In: *Stem Cell*, New York: Academic Press; p 283-308.
- Skinner, J.D., Louw, G.N. 1966. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J Appl Physiol.* 21:1784-90.
- Smith, A, V., Ferres E.T., Montecinos, M. Castro-Girona. Manual de Embriología y Anatomía General. 1992. Universitat de Valencia. 945 (1):64.

- Suarez, S.S. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev.* 19:103-10.
- Tortolero, I., Arata-Bellabarba., Osuna G., Gómez, J.A., Regadera, R, J. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo.* 2005. 3(3): 12-19.
- Urbina, M. T. y Lerner, J. 2008. Fertilidad y Reproducción asistida. Editorial Médica Panamericana. 623 (1): 117.
- Van Wagtedonk, D.E., Leeuw Aerts, B.J, Den Daas, J.H. 1998. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplatation embryos: a field study. *Theriogenology.* Jan 15:53(2):575-97.
- Vázquez, R., Martínez, R., Manriquez, C., Rodríguez, Y. 2007. Evaluación genética del comportamiento productivo y reproductivo en núcleos de conejos de las razas nueva Zalanda y Chinchilla. *Revista corpoica – ciencia y tecnología agropecuaria* 8(1):69-74.
- Welsch, Ulrich. *Histología/Sobotta.* 2ª edición. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana. 2008. XI, 688 (9): 476-484.
- Zalata, A., Ahmed, A., Allamaneni, S., Comhaire, F., Agarwal, A. 2004. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 6:313-318.

Anexo 1

Composición nutricional del alimento de que se le proporcione a los animales durante el experimentó.

CONEJINA N			
REGISTRO SAGARPA A-0207-022			
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL			
HUMEDAD	12.00%MAX	FIBRA	15.00% MAX
PROTEINA	15.50 MIN	CENIZAS	9.00% MAX
GRASA	2.00% MIN	E.L.N.	46.50% P. DIF.
CALCIO	1.00% MIN	FOSFORO	0.55% MIN

VITAMINAS		
VITAMINA A (UI/kg)	VITAMINA A (UI/kg)	VITAMINA A (UI/kg)
6000	6000	6000

Características nutricionales del alimento Purina.