



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

EFFECTIVIDAD DEL USO DE SEMEN CONGELADO ADICIONADO CON EXTRACTO
ANTIOXIDANTE DE NOPAL EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL POR
LAPAROSCOPIA EN OVEJAS.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

PRESENTA

M.V.Z. Enrique Ramírez Ayala

Dirigido por:

DR. Héctor Raymundo Vera Ávila

Querétaro, Qro. A de Septiembre del 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

***EFFECTIVIDAD DEL USO DE SEMEN CONGELADO ADICIONADO CON EXTRACTO
ANTIOXIDANTE DE NOPAL EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL POR
LAPAROSCOPIA EN OVEJAS.***

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

PRESENTA

M.V.Z. Enrique Ramírez Ayala

Dirigido por:

DR. Héctor Raymundo Vera Ávila

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Presidente

Dr. Luis Javier Montiel Olguín

Secretario

Dr. Germinal Jorge Canto Alarcón

Vocal

Dr. Juan Carlos Silva Jarquín

Vocal

Dra. Marina Duran Aguilar

Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis:

A mi abuelo que en vida me cuidaste y que ahora lo haces desde el cielo, a mi mama por ser la primera en alentarme a seguir mis sueños, por su amor y apoyo incondicional, a mi papa por enseñarme el amor y respeto a los animales y ser mi mentor en esta profesión, y la Lic. Lili García Mendieta por acompañarme en todo momento a lo largo de este camino.

AGRADECIMIENTO

A mi comité tutorial, Dr. Vera, Dr. Montiel, Dr. Juan Carlos, Dr. Cantó y Dra. Marina.

A mi equipo de trabajo, Luz Elena, Luz Hernández.

Al M.V.Z. Enrique Ramírez Pérez por facilitarme el ultrasonido para el trabajo.

Al M.V.Z Daniel Morales González por la capacitación en IA por laparoscopia y el acceso a rancho HEAR

AL M en SPAS Oscar Olvera Bermúdez por la capacitación en el procesamiento del semen

A Mauricio Lavín Patiño y José Sinecio Robles por facilitarme el acceso a rancho el risco

A la MSPAS.

A CONACYT por el apoyo económico.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTO	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUCCIÓN	11
2 ANTECEDENTES	12
2.1 Ovinocultura	12
2.1.1 Ovinocultura en México	12
2.2 Espermatozoide	13
2.3 Evaluación de la capacidad reproductiva del semental	14
2.3.1 Colecta de semen	15
2.3.2 Color	15
2.3.3 Volumen	16
2.3.4 Concentración espermática	16
2.3.5 Motilidad masal	17
2.3.6 Motilidad progresiva	19
2.3.7 Morfología	19
2.4 Procesamiento del semen	20
2.4.1 Diluyentes	21
2.4.2 Refrigeración	22
2.4.3 Congelado	22
2.4.4 Descongelado	22
2.5 Extracto de nopal <i>Opuntia-ficus</i>	23
2.6 Actividad Ovárica en ovejas	24
2.6.1 Fotoperiodo	24
2.6.2 Ciclo estral en ovejas	25
2.7 Sincronización del ciclo estral	25
2.7.1 Sincronización con prostaglandinas	26

2.7.2 Sincronización con CIDR	26
2.8 Inseminación artificial en ovinos.....	27
2.9 Diagnóstico de gestación en ovejas	28
2.9.1 No retorno al estro	28
2.9.2 Ecografía como diagnóstico de gestación.....	28
3 JUSTIFICACIÓN	30
4 HIPOTESIS	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
6 MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Bioética	33
6.2 Ubicación	33
6.3 Población y muestra.....	34
6.4 Experimento	34
6.4.1 Obtención de extracto de nopal <i>Opuntia-ficus</i>	34
6.4.2 Obtención del semen	35
6.4.3 Procesamiento del semen	35
6.4.4 Manejo de los animales	37
6.4.5 Sincronización del estro.....	38
6.4.6 Descongelado del semen	38
6.4.7 Inseminación artificial por laparoscopia	38
6.4.8 Diagnostico de gestación por ecografía	39
6.5 Diseño experimental	39
6.6 Análisis estadístico	40
7 RESULTADOS	41
7.1 Evaluación de la motilidad progresiva	41
7.2 Sincronización del estro.....	41
7.3 Fertilidad de las ovejas	42
7.3.1 Fertilidad por tratamiento.....	43
7.3.1 Fertilidad unidad de producción.....	44
7.3.3 Fertilidad por Edad	45
7.3.4 Fertilidad por Condición Corporal.....	45

8	DISCUSIÓN	47
9	CONCLUSIÓN	50
10	BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO 1	57
	Inseminación artificial por laparoscopia	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentración del semen de carnero valorado mediante la consistencia.	16
2. Valoración semicuantitativa de la motilidad masal.	18
3. Diferencias entre los tipos de conservación del semen.	21
4. Porcentaje de motilidad progresiva individual utilizando como aditivo del diluyente extracto acetónico de nopal.	23
5. Tipos de inseminación artificial en ovejas.	27
6. Motilidad progresiva de espermatozoides de carnero procesados usando un diluyente comercial (T0) o diluyente comercial adicionado con 0.5% de extracto antioxidante de nopal (T1).	42
7. Tasa general de gestaciones por unidad de producción.	43
8. Tasa de gestión en ovejas inseminadas con semen procesado usando un diluyente comercial (T0) o un diluyente comercial adicionado con 5% de extracto antioxidante de nopal (T 1).	44
9. Tasa de gestación por Unidad de Producción en ovejas inseminadas con semen procesado usando un diluyente comercial (T0) o un diluyente comercial adicionado con 5% de extracto antioxidante de nopal (T 1).	45
10. Tasa de gestación en relación a la EDAD.	46
11. Tasa de gestación en relación a la Condición Corporal.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Principales países productores de carne de borrego a nivel mundial.	12
2. Esquema de un espermatozoide.	14
3. Escala de colores de semen de carnero.	15
4. Representación de una cuadrícula de la cámara de Neubauer,	17
5. Motilidad masal con valor de 5 en semen de carnero.	18
6. Anormalidades morfológicas de los espermatozoides.	20
7. Actividad reproductiva de los animales domésticos.	25
8. Colecta de semen de carnero con vagina artificial.	35
9. Pajillas de semen en el espejo de nitrógeno.	36
10. Diagnóstico de gestación vía rectal en oveja.	37
11. Imagen ecográfica de placentoma en oveja.	37
12. Inseminación artificial por laparoscopia en oveja.	39
13. Diagnóstico de gestación por ecografía 35 días post-inseminación.	40
14. Perforación de cuerno uterino para la deposición de semen.	59

RESUMEN

Palabras clave; Semen congelado. Viabilidad espermática. Antioxidante natural. Carnero.

Los espermatozoides del carnero son susceptibles a daños por estrés oxidativo durante la criopreservación. En trabajos previos, se encontró que la adición de un extracto antioxidante de nopal al diluyente para enfriamiento/congelación de espermatozoides, mejora su motilidad progresiva. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de uso de un extracto antioxidante de nopal como aditivo al diluyente usado en el procesamiento de semen y probar su efecto en campo sobre la tasa de gestación en la inseminación artificial (TG+). Los tratamientos fueron: T0 grupo testigo (solo diluyente) Y T1 adición de 0.5 % de extracto de nopal al diluyente, el total de espermatozoides por dosis fue de 50×10^6 en ambos grupos y el diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía transrectal 35 días post servicio. El trabajo se llevó a cabo en 3 rebaños (Duraznitos, Amazcala y Hear), entre los meses de abril y julio. En el análisis estadístico se utilizaron 3 modelos incluyendo en cada uno el efecto de tratamiento (TRT) más el efecto de unidad de producción (MOD 1), categoría de edad ≤ 2 vs > 2 años (MOD 2) o categoría de CC CCH, ≤ 2.5 vs > 2.5 (MOD 3). Se inseminaron 93 ovejas de las cuales 54 resultaron gestantes (58%). En el modelo que incluyó unidad de producción (MOD1) se observó tendencia de efecto para la interacción TRT x UP (83 vs 50 %, 57 vs 67 % y 36 vs 50 % para T1 vs T0 en Duraznitos, Hear y Amazcala; $P=0.07$). Solamente en una de las unidades de producción hubo diferencia entre tratamientos, con una tasa de gestación mayor en el grupo en que se usó el aditivo antioxidante como parte del diluyente para procesar el semen (Duraznitos = 83 vs 50 % para T1 vs T0, $P \leq 0.05$). En el MOD2 que incluyo EDH (Edad) se observó tendencia de efecto de categoría de edad como efecto principal (71% vs 52 % de tasa de gestación en ovejas ≤ 2 vs > 2 años; $P=0.07$), sin efecto de interacción con TRT. Se concluye que el uso de extracto antioxidante de nopal como aditivo en el proceso de criopreservación de semen ovino muestra tener un efecto positivo sobre la fertilidad a la I.A. bajo algunas condiciones. Sin

embargo, es de suma importancia continuar investigando este efecto para obtener conclusiones más firmes.

ABSTRACT

Key words: Frozen semen. Sperm viability. Natural antioxidant. Ram.

Ram sperm are susceptible to oxidative stress damage during cryopreservation. In previous works, it was found that the addition of an antioxidant extract of prickly pear to the diluent for cooling/freezing of spermatozoa improves their progressive motility. The objective of this study was to evaluate the effect of using an antioxidant extract of prickly pear as an additive to the extender used in semen processing and to test its effect in the field on the pregnancy rate in artificial insemination (TG+). The treatments were: T0 control group (only diluent) and T1 addition of 0.5% of nopal extract to the diluent, the total number of spermatozoa per dose was 50×10^6 in both groups and the pregnancy diagnosis was made by transrectal ultrasonography 35 days post service. The work was carried out in 3 herds (Duraznitos, Amazcala and Hear), between the months of April and July. In the statistical analysis, 3 models were used, each including the treatment effect (TRT) plus the production unit effect (MOD 1), age category ≤ 2 vs > 2 years (MOD 2) or CC CCH category, ≤ 2.5 vs > 2.5 (MOD 3). 93 ewes were inseminated, of which 54 were pregnant (58%). In the model that included production unit (MOD1), a trend of effect was observed for the TRT x UP interaction (83 vs 50%, 57 vs 67% and 36 vs 50% for T1 vs T0 in Duraznitos, Hear and Amazcala; $P = 0.07$). Only in one of the production units was there a difference between treatments, with a higher pregnancy rate in the group in which the antioxidant additive was used as part of the extender to process the semen (Peaches = 83 vs 50 % for T1 vs T0, $P \leq 0.05$). In the MOD2 that included EDH (Age), a trend of the effect of age category was observed as the main effect (71% vs 52% of pregnancy rate in ewes ≤ 2 vs > 2 years; $P = 0.07$), without an interaction effect with TRT. It is concluded that the use of cactus antioxidant extract as an additive in the cryopreservation process of ovine semen shows to have a positive effect on fertility at A.I. under some conditions.

However, it is of the utmost importance to continue investigating this effect in order to obtain firmer conclusions.

1 INTRODUCCIÓN

Las Especies Reactivas a Oxígeno (ERO), son moléculas inestables que contienen oxiradicales (radicales libres), esto les confiere la capacidad de oxidar las membranas celulares. Por lo anterior, son capaces de actuar en los sistemas biológicos produciendo cambios en la composición estructural de los elementos celulares. Los espermatozoides de carnero son muy susceptibles al daño por oxidación causado por (ERO) ya que contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (Mehdipour *et al.*, 2016). El enfriamiento/congelación de semen de carnero reduce la motilidad y afecta la integridad de la membrana espermática, estos cambios son asociados con una pérdida de la capacidad fertilizante. Aunque muchos espermatozoides siguen siendo motiles después del descongelado, sus membranas se desestabilizan de manera similar a lo que ocurre durante la capacitación espermática pudiendo presentarse reacciones acrosómicas prematuras (Maxwell *et al.*, 1996). Esto representa un impedimento para masificar el uso de sementales de alto valor genético. La adición de antioxidantes al diluyente durante el proceso de congelación de semen puede disminuir el estrés oxidativo causado por las ERO y con ello mantener las funciones normales de los espermatozoides (Mehdipour *et al.*, 2016). La Inseminación Artificial (I.A.) en ovejas se puede lograr mediante el uso de semen congelado vía laparoscópica siendo la única técnica que genera tasas de gestación aceptables (Cseh *et al.*, 2012). En 2019., Olvera *et al.* Encontraron que la adición de 0.5% de extracto antioxidante de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en un diluyente comercial, mejora la motilidad y viabilidad post-congelado/descongelado de los espermatozoides de carnero. Sin embargo, se hace necesario valorar si esta mejora se ve reflejada en la fertilidad a la I.A. con dosis procesadas utilizando el aditivo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de extracto antioxidante de nopal en el procesamiento de dosis a baja concentración espermática, sobre la fertilidad en ovejas inseminadas por laparoscopia.

2 ANTECEDENTES

2.1 Ovinocultura

La ovinocultura es una práctica pecuaria que se realiza a nivel global, el mercado ha tenido un incremento en los últimos años. Los países con mayor número de producción anual de carne son los siguientes: China, Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda, Sudán, Turquía, Reino Unido, Argelia, India, Nigeria y Rusia, produciendo un total de 8.6 millones de toneladas, esto representa un 67.7% de la producción mundial en el 2016 (Figura 1) (FAOSTAT, 2016).

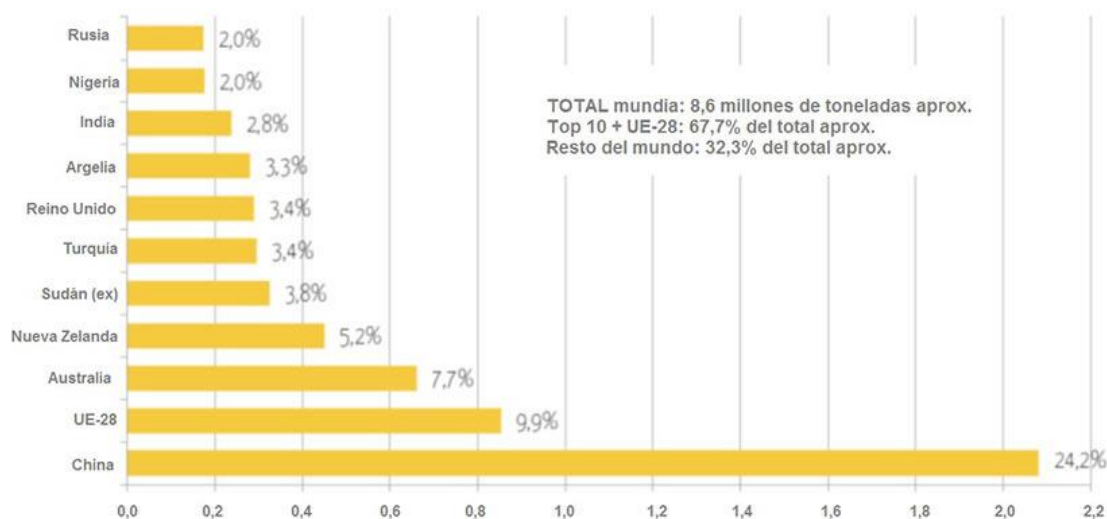


Figura 1. Principales países productores de carne de borrego a nivel mundial (FAOSTAT, 2016).

2.1.1 Ovinocultura en México

La cría de ovinos en México es parte importante de la producción de alimentos de origen animal, esta industria ha incrementado a lo largo de los años debido al

aumento de la demanda de carne ovina (Dávila *et al.*, 2013). La industria ha evolucionado a lo largo de los años, algunos de los sistemas de producción tradicionales se han tecnificado, teniendo como resultado un aumento de la producción de carne y sus subproductos (AMCO, 2007). Actualmente el inventario nacional de ovinos es de 8, 708,246. En el país se producen 64,031 toneladas de carne de ovino anualmente, siendo los principales productores a nivel nacional: CDMX, Hidalgo, Veracruz, Jalisco, Puebla y Zacatecas. Querétaro aporta anualmente a la producción nacional 1,065 toneladas anualmente (SIAP, 2019).

2.2 Espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide especializada, esta transporta su información genética hasta el ovocito. Su estructura está compuesta de una cabeza (con núcleo y capuchón acrosómico) y una cola con tres porciones (principal, intermedia y terminal) (Figura 2). Esta célula contiene escaso citoplasma y un núcleo con cromatina muy condensada (Aisén, 2004). La membrana plasmática del espermatozoide es diferente a la de las células somáticas (Barrios *et al.*, 2000), estos están recubiertos por una membrana nuclear no porosa (el capuchón), esta membrana es delgada de doble capa que contiene enzimas proteolíticas para poder llevar a cabo el proceso de fertilización (Aisén, 2004). Los espermatozoides al salir de los testículos son acompañados de la secreción de diversas glándulas del tracto reproductivo del macho conocida como plasma seminal, estos al salir de los testículos detienen su producción de lípidos y proteínas siendo incapaces de fertilizar ovocitos, esta capacidad es lograda en el tracto reproductivo de la hembra mediante un proceso llamado capacitación (Barrios *et al.*, 2000).

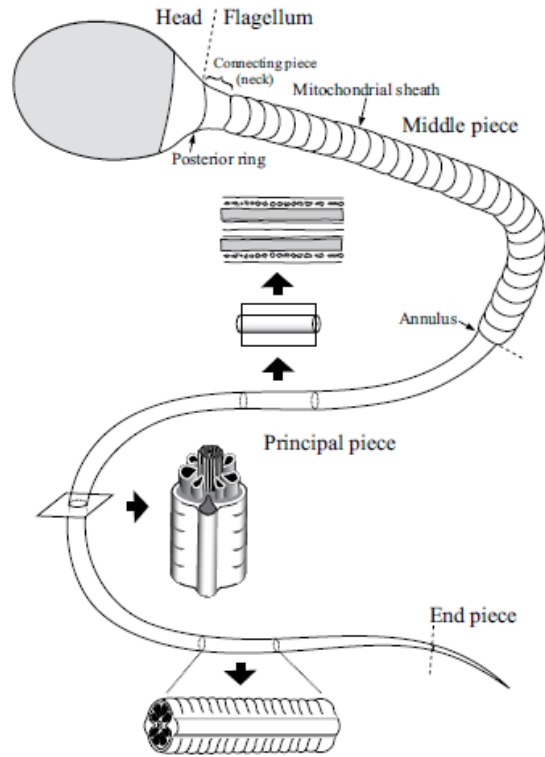


Figura 2. Esquema de un espermatozoide (Plant *et al.*, 2014).

2.3 Evaluación de la capacidad reproductiva del semental

La evaluación de los sementales es de suma importancia para la empresa ovina, en condiciones óptimas los carneros cuentan con un potencial para gestar a 100 ovejas en un periodo de 17 días (Sharkey *et al.*, 2001). La fertilidad de los machos es evaluada mediante el examen del semen en donde se determinan diversas características físicas y funcionales, este examen es un indicador del potencial de fertilidad (Hafez *et al.*, 2000). El proceso de congelación/descongelación induce cambios funcionales en los espermatozoides que se deben evaluar de igual manera que en el examen del semen (Donovan *et al.*, 2001).

2.3.1 Colecta de semen

El semen puede ser recolectado mediante dos maneras: colecta con vagina artificial (VA) o por estímulos eléctricos de un electroeyaculador, siendo el método de predilección (VA) por causar el menor estrés al animal siendo un método rápido y sencillo que genera como resultado, una recolección seminal de mejor calidad (Donovan *et al.*, 2001).

2.3.2 Color

De manera normal el semen de carnero tiene un color lechoso a cremoso (Figura 3), este puede presentar cambios de coloración que indican anomalías, un color rojizo sugiere una lesión en el pene, el color gris sugiere contaminación de la muestra o infección del tracto reproductivo, dependiendo del método de colecta de la muestra (electroeyaculado) el animal puede orinar generando un semen amarillo y diluido (Sharkey *et al.*, 2001).

APARIENCIA DEL SEMEN		CALIFICACIÓN
Translúcida		Mala
Leche desnatada		Regular
Lechosa		Buena
Cremosa		Muy buena

Figura 3. Escala de colores de semen colectado en carneros (Boeta *et al.*, 2018).

2.3.3 Volumen

Este se determina por la cantidad total del semen recolectado y es variable dependiente a diversos factores como: el método de recolección donde se obtienen mayores cantidades con el electroeyaculador, debido a una sobre estimulación de las glándulas accesorias (independiente de la concentración) y menores cantidades cuando es colectado con vagina artificial, también influyen factores como: edad, estado físico del animal, la estación del año y la frecuencia de la colecta. El volumen promedio en animales adultos es de 0.5 a 2 ml (mayores a 14 meses) y en jóvenes (8 a 14 meses) de 0.5 a 0.7 ml (Hafez *et al.*, 2000; Sharkey *et al.*, 2001).

2.3.4 Concentración espermática

La concentración espermática es la cantidad de espermatozoides en un eyaculado. La determinación del número de espermatozoides y del volumen del eyaculado permite definir en el procesamiento de semen el número de dosis que se pueden obtener en uno o varios eyaculados. La concentración espermática se mide mediante conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer (Figura 4) o por una espectrofotometría. De manera normal la concentración espermática en un carnero adulto varía de los 3500 millones a 6000 millones por ml. Se puede realizar una valoración subjetiva de la concentración mediante la consistencia del esperma (Cuadro 1) ((Salamon *et al.*, 1995; Hafez *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Concentración del semen de carnero valorado mediante la consistencia (Salamon *et al.*, 1995; Hafez *et al.*, 2000).

Puntuación	Consistencia	Número de espermatozoides (x10 ⁹)	
		Media	Rango
5	Doble crema	5.0	4.5-6.0
4	Cremoso	4.0	3.5-4.5
3	Cremosos diluido	3.0	2.5-3.5

2	Lechoso	2.0	1.0-2.5
1	Brumoso	0.7	0.3-1.0
0	Transparente	Insignificante	

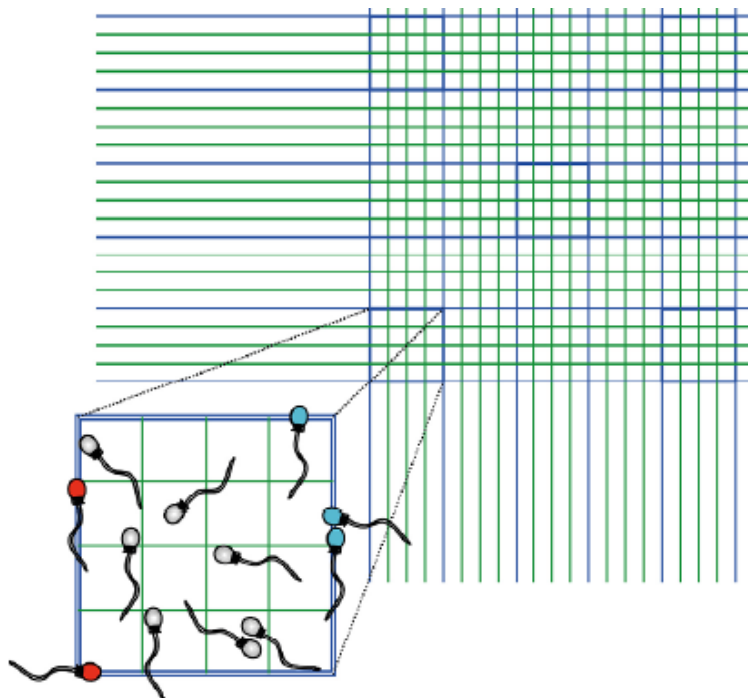


Figura. 4 representación esquemática de una de las cuadrículas de la cámara de Neubauer (Boeta *et al.*, 2018).

2.3.5 Motilidad masal

El movimiento espermático es una manera de determinar la calidad del semen; el semen de los ovinos presenta ondas características en la evaluación microscópica (Figura 5), estas ondas son evaluadas de manera subjetiva en una escala numérica del 0 a 5 (Cuadro 2). Esta evaluación es realizada de manera rápida y es un examen preliminar para determinar si el semen es apto o no para su procesamiento (Aisén, 2004).

Cuadro 2. Valoración semicuantitativa de la motilidad masal (Aiséñ, 2004).

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas densas de movimientos muy rápidos
4	Buena	Ondas y movimientos vigorosos pero no tan rápidos
3	Regular	Ondas de movimiento lento
2	Pobre	No aparecen ondas pero se observan movimientos espermáticos
1	Muy pobre	Muy pocos movimientos
0	Muertos	Sin movimientos

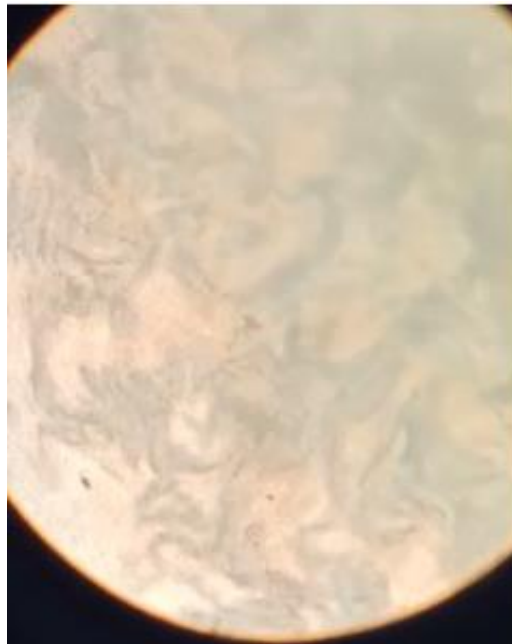


Figura 5. Motilidad masal con valor de 5 en semen de carnero (Laboratorio de reproducción animal UAQ, 2021).

2.3.6 Motilidad progresiva

La motilidad progresiva es un parámetro a evaluar del porcentaje de espermatozoides que avanzan de manera rectilínea en un campo microscópico, respecto al porcentaje total de motiles (Álvarez *et al.*, 2019), los espermatozoides pueden presentar movilidad sobre su propio eje siendo un indicador de nula motilidad progresiva, esto puede ser referente a un choque térmico o a un medio inadecuado donde se encuentra el semen (Aisén, 2004).

2.3.7 Morfología

La evaluación de la morfología de los espermatozoides analiza la integridad de estos. En cada eyaculado se encuentra una proporción de espermatozoides anormales (Figura 6) cuando la proporción es elevada el semen es de baja fertilidad (Aisén, 2004). El semen con 15% o más de espermatozoides anormales, no puede ser incluido en un programa de reproducción asistida y cuando se encuentra un 20% o más de anomalías es cuestionable la fertilidad del animal (Hafez *et al.*, 2000). Las anomalías espermiáticas pueden ser de 3 tipos:

- Primarias (se originan en la espermatogénesis).
- Secundarias (durante el paso en el epidídimo).
- Terciarias (de origen iatrogénico).

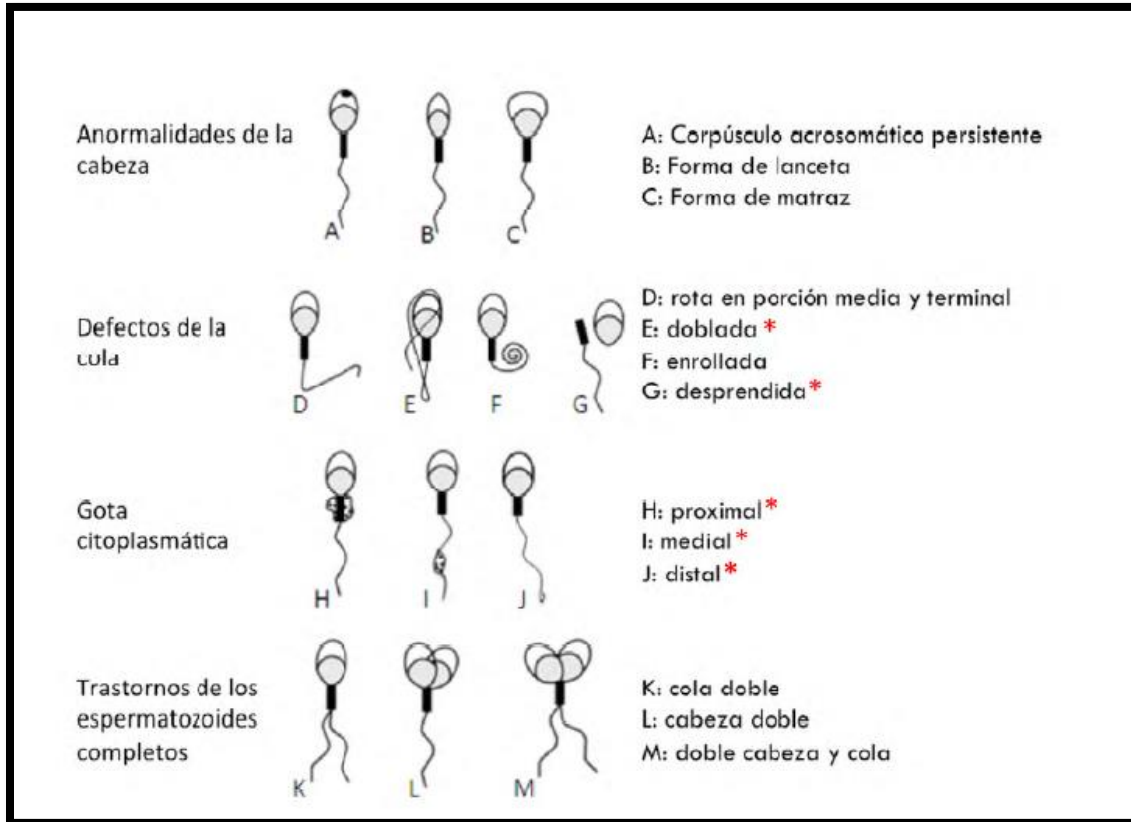


Figura 6. Anormalidades morfológicas de los espermatozoides (Boeta *et al.*, 2018).

2.4 Procesamiento del semen

La conservación del semen es de suma importancia para la IA (Salamon *et al.*, 1995), debido a que este es un proceso previo para llevar a cabo dicha técnica, esto permite una mejora genética en el ganado, la maximización de uso de sementales con características deseadas y un control en la transmisión de enfermedades reproductivas (Cseh *et al.*, 2012). Los espermatozoides tienen un periodo corto de supervivencia fuera del aparato reproductivo a temperatura ambiente. Los programas de IA en ovinos necesitan de la conservación del semen en condiciones artificiales y en diferentes periodos de tiempo, esto es logrado mediante métodos que reducen o detienen el metabolismo de los espermatozoides, prolongando su vida útil (Salamon *et al.*, 1995). El principal problema para la conservación del semen de carnero es que los componentes del plasma seminal deterioran afectando

la viabilidad de los espermatozoides (Salamon *et al.*, 1995; Cseh *et al.*, 2012). El semen puede conservarse para 3 usos básicos (Cuadro 3): semen fresco, semen refrigerado y semen congelado (Aisén, 2004).

Cuadro 3. Diferencias entre los tipos de conservación del semen (Aisén, 2004; Salamon *et al.*, 1995; Cseh *et al.*, 2012).

	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen congelado
Condición de los espermatozoides	Los espermatozoides continúan con su metabolismo, teniendo un periodo corto de vida.	La refrigeración del semen reduce el metabolismo de los espermatozoides y prolonga su vida útil.	El congelamiento del semen tiene como finalidad detener de manera completa el metabolismo de los espermatozoides.
Temperatura de conserva	30°-36°	5°-15°	-196°
Tiempo de conserva	1-1.5 horas	12-24 horas	Indefinidamente
Deposición en el tracto reproductivo	Vía vaginal	Vía vaginal y cervical	Intrauterina

2.4.1 Diluyentes

El plasma seminal del carnero, a diferencia del bovino, no proporciona una protección a los espermatozoides ante los cambios de temperatura (Salamon *et al.*, 1995; Cseh *et al.*, 2012). Debido a esto, es necesario realizar una dilución del semen en medios especializados, estos medios proporcionan: nutrientes (azúcares), crioprotectores (yema de huevo, glicerol, etilenglicol), antibióticos y amortiguadores (citrato de sodio, fosfato de sodio) que mantienen un pH adecuado,

todos estos componentes protegen a los espermatozoides de daños causados en la criogénesis (Salamon *et al.*, 1995; Boeta *et al.*, 2018).

2.4.2 Refrigeración

La refrigeración del semen es un proceso de adaptación del eyaculado diluido. Cseh *et al.*, en el 2012 mostraron que los espermatozoides mantienen niveles aceptables de motilidad progresiva a una temperatura de 2 a 5°C. Esto logra una reducción del metabolismo de los espermatozoides, además de tener la función de ser punto de equilibrio entre los componentes del diluyente y los espermatozoides. El cambio gradual de temperaturas, de 37°C a 2°-5°C influye en la supervivencia espermática previa al congelado (Salamon *et al.*, 1995).

2.4.3 Congelado

El congelado es el proceso posterior al enfriamiento, es utilizado para detener el metabolismo de los espermatozoides. Esto permite la conserva de los espermatozoides produciendo una congelación intracelular, este proceso representa un riesgo para los espermatozoides, debido a que se pueden originar cristales de hielo que los dañen de manera interna (Salamon *et al.*, 1995).

2.4.4 Descongelado

De la misma manera que el proceso de congelado, el proceso de descongelado del semen tiene una gran importancia para la supervivencia de los espermatozoides (Salamon *et al.*, 1995). Este proceso reactiva su metabolismo por un periodo de tiempo de hasta 3 minutos, esto es logrado al descongelar las dosis por 20 segundos a una temperatura de 37°C, simulando una temperatura similar a la del organismo (Hafez *et al.*, 2000)

2.5 Extracto de nopal *Opuntia-ficus*

Los espermatozoides de carnero son muy susceptibles a sufrir daño por oxidación a causa de Especies Reactivas a Oxígeno (ERO) ya que contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (Mehdipour *et al.*, 2016). El enfriamiento y congelación de semen de carnero reduce la motilidad y afecta la integridad de la membrana espermática, estos cambios son asociados con una pérdida de la capacidad fertilizante; aunque muchos espermatozoides siguen siendo motiles después del descongelado, sus membranas se desestabilizan de manera similar a lo que ocurre durante la capacitación espermática, pudiendo presentarse reacciones acrosómicas prematuras (Mehdipour *et al.*, 2016)...

Agregando antioxidantes al diluyente durante el proceso de congelación de semen, puede disminuirse el estrés oxidativo causado por las ERO y con ello mantener las funciones normales de los espermatozoides (Mehdipour *et al.*, 2016).

Un estudio evaluó el efecto de adición de extracto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) al diluyente utilizado en el proceso de enfriamiento de semen de carnero, donde se encontró una mejora en motilidad y viabilidad espermática, así como disminución en el porcentaje de espermatozoides anormales y peroxidación de lípidos de membrana, al incorporar 1% del extracto en el diluyente. El efecto protector del extracto de nopal durante el procesamiento del semen es de utilidad para mejorar la viabilidad espermática (Allai *et al.*, 2016). En el 2019 Olvera *et al* demostró que la adición de 0.5% de extracto acetónico de nopal concentración mejoraba la motilidad progresiva de los espermatozoides de carnero (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de motilidad progresiva.

Variable	T0	T0,5	T1,0	T1,5	e.e.m.	P
MP Enf	68.5	72.5	63,0	16,0	2,7	<0.001
MP Des	38.7	44.2	33,7	8,2	1,3	<0.001

MP Enf: Motilidad progresiva individual al término del enfriamiento. MP Desc: Motilidad progresiva al descongelado (Olvera *et al.*, 2019).

2.6 Actividad Ovárica en ovejas

La actividad reproductiva de las ovejas adultas está determinada por dos ritmos diferentes:

1. Un ciclo estral de 16 a 17 días de duración.
2. Un periodo anual de ciclicidad ovárica caracterizado por una pausa dependiendo de la temporada (anestro) y una restauración de la actividad ovárica (época reproductiva). (Bartlewski *et al.*, 2011).

Este último es más marcado en algunas razas. Las ovejas son poliéstricas estacionales con ciclos estrales continuos en la época reproductiva (Uribe-Velásquez., *et al* 2009; Bartlewski *et al*, 2011).

2.6.1 Fotoperiodo

Uno de los factores más importantes que influye en la actividad reproductiva de los ovinos es la relación horas luz contra las horas de oscuridad (fotoperiodo), los ovinos muestran mayor actividad reproductiva cuando esta relación es de 16 horas de oscuridad y 8 horas de luz (Figura 7) (Boeta *et al.*, 2018).

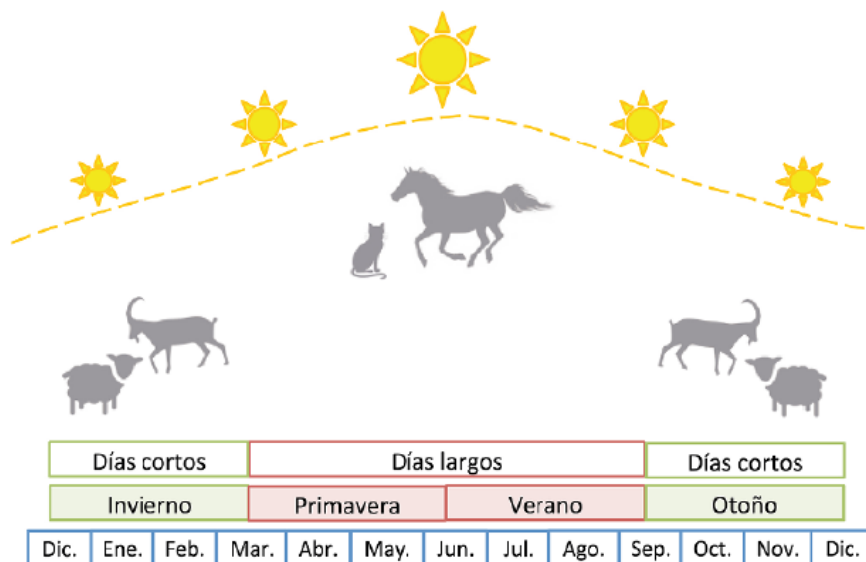


Figura 7. Actividad reproductiva de los animales domésticos (Boeta *et al.*, 2018).

2.6.2 Ciclo estral en ovejas

En la estación reproductiva las ovejas presentan ciclos estrales cada 17 días. El diestro tiene una duración de 11 (periodo del cuerpo lúteo), en esta etapa prevalece el efecto de la hormona progesterona. El proestro dura 2 días, que es el periodo en que el aparato reproductivo se prepara para las manifestaciones del estro, se puede ver edema de la vulva y las glándulas comienzan a producir moco. El estro (calor) dura de 24 a 36 horas y en él influyen raza, edad, estación y presencia del macho. Las razas productoras de lana tienen periodos de estro más largos que las razas productoras de carne. El metaestro también dura 2 días y es el periodo que sigue al estro, momento en que se inicia el desarrollo del cuerpo lúteo (Galina *et al* 2008 Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

2.7. Sincronización del ciclo estral

Los tratamientos con hormonas para el control del ciclo estral permiten reactivar la ciclicidad ovárica en hembras en anestro y sincronizar la aparición de estros en hembras ciclando (Uribe-Velásquez *et al.*, 2007), además realizar manejos como: montas programadas y la sincronización de partos (Aké-López *et al.*, 2014). Existen

diversas hormonas usadas para la sincronización del estro entre las cuales se encuentran: progesterona (P4) usada en asociación con gonadotropina coriónica equina (EGC) Y prostaglandina (PGF2 α) (Uribe-Velásquez *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2011). La manipulación del ciclo estral permite mejorar el manejo reproductivo de los rebaños (Arroyo *et al.*, 2013) y el uso de programas reproductivos como la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) (Prieto *et al.*, 2011; Arroyo *et al.*, 2013; Aké-López *et al.*, 2014).

2.7.1 Sincronización con prostaglandinas

El cuerpo lúteo (CL) es una estructura ovárica formada posterior a la ovulación este tiene la función de liberar progesterona al torrente sanguíneo, está evita la ciclicidad ovárica, las prostaglandinas actúan sobre el CL lisándolo esto provoca un descenso en los niveles de progesterona y un aumento en los niveles de estradiol, esto induce un pico pre ovulatorio de LH que trae como consecuencia la ovulación (Prieto *et al.*, 2011). El usos de prostaglandinas para el control del ciclo estral es usado en ovejas con actividad ovárica, lisando el cuerpo lúteo y provocando la presencia de estro 48- 72 horas después de su aplicación En las ovejas no es posible seleccionar a los animales por tratar con PGF2a mediante palpación rectal del cuerpo lúteo a diferencia de las vacas, por lo que para asegurar una alta proporción de ovejas sincronizadas es aplicar dos tratamientos de PGF2a con un intervalo de 8 a 9 días asegurando que todas las ovejas del rebaño hayan pasado por una fase lútea. (Cerón *et al.*, 2001). Este método tiene la ventaja de no introducir un cuerpo extraño como se hace previniendo infecciones y la disminución de costos (Prieto *et al.*, 2011; Espinosa-Martínez *et al* 2020).

2.7.2 Sincronización con CIDR

El CIDR es un dispositivo intra-vaginal de liberación controlada de progesterona (Arroyo *et al.*, 2013.), estos usan la progesterona para imitar la actividad del cuerpo lúteo (Martínez-Ros *et al.*, 2019). El uso de estos dispositivos intravaginales trabaja

en sinergia con la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG), esto favorece la aparición de nuevos folículos y aumenta la tasa de fertilidad (Arroyo *et al.*, 2013; Espinosa-Martínez *et al.* 2020). Esto ha demostrado ser un protocolo efectivo en la inducción del estro incluso en periodos de estacionalidad (Arroyo *et al.*, 2013., Martínez-Ros *et al.*, 2019).

2.8 Inseminación artificial en ovinos

En ovinos y bovinos los trabajos realizados en inseminación artificial fueron realizados por Ivanov en 1907 en Rusia, actualmente la inseminación artificial (IA) es la técnica de reproducción asistida de mayor importancia para la mejora genética animal, sin embargo existen problemas: científicos, sociales y económicos que influyen en la difusión masiva de la técnica en ovinos a diferencia de su uso en bovinos (Aisén, 2004). La I.A. consiste en que las células sexuales del macho (espermatozoides) son depositadas dentro del tracto reproductivo de la hembra, para que se lleve a cabo la fecundación del óvulo por medios distintos al de la cópula natural, donde no existe contacto directo entre los animales (Álvarez *et al.*, 2019) La IA se puede lograr mediante el uso de semen fresco (deposición vaginal o cervical) o con el uso de semen congelado (laparoscopia) (Cuadro 5) siendo la única técnica que genera tasas de concepción aceptables (Sharkey *et al.*, 2001), sin embargo el uso de semen congelado tiene una menor viabilidad y motilidad debido a la criopreservación (congelado/ descongelado). (Cseh *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Tipos de inseminación artificial en ovejas (Aisén, 2004; Cseh *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2019).

Variables	IA vaginal	IA cervical	IA intrauterina
Semen utilizado	Fresco	Fresco/ congelado.	.congelado
Concentración espermática necesaria	400 millones	200 millones	100 millones

Porcentaje de éxito	30%	40%	40-60%
---------------------	-----	-----	--------

2.9 Diagnóstico de gestación en ovejas

Una de las herramientas básicas para mejora de la rentabilidad de las unidades de producción ovinas es el diagnóstico de gestación, este tiene como objetivo disminuir las pérdidas económicas provocadas por ovejas no gestantes. (Peña *et al.*, 1999), la gestación se puede determinar mediante diversas pruebas (Dávila *et al.*, 2013).

2.9.1 No retorno al estro

El método consiste en la introducción de un macho celador (provisto con un mandil o vasectomizado), aun lote de hembras empadradas o inseminadas entre los días 18 y 26, si la hembra no presenta celo y acepta la monta, puede ser indicio de gestación (Boeta *et al.*, 2018).

2.9.2 Ecografía como diagnóstico de gestación

La técnica de mayor relevancia para el diagnóstico de gestación en ovejas es la ultrasonografía o ecografía, además ha sido de gran ayuda para la investigación de los eventos reproductivos (Desarrollo de oleadas foliculares). Esta técnica emplea ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de los tejidos internos, las cuales se transmiten a través de un monitor. El uso de la ultrasonografía ofrece: un diagnóstico de gestación precoz, sexado de crías, determinación del desarrollo folicular, desarrollo del cuerpo lúteo y una evaluación de posibles procesos patológicos del tracto reproductivo (Dávila *et al.*, 2013). Existen dos vías para el uso de la ecografía; la transabdominal que ofrece un gran eficacia para el diagnóstico de

gestaciones posteriores a los 30 días del empadre y la transrectal que permite la detección de gestaciones tempranas a partir de los 20 días del empadre además de un panorama más amplio de los eventos reproductivos (Peña *et al.*, 1999., Quintela *et al.*, 1999).

3 JUSTIFICACIÓN

La pérdida de viabilidad y capacitación espermática prematura en el semen de los carneros, por efecto de la enfriamiento/congelación, son factores que limitan su uso en la I.A.

Para compensar el daño durante el enfriamiento/congelación se aumenta la cantidad de espermatozoides por dosis (~100 millones), por lo tanto disminuye el número de dosis por eyaculado.

La adición de extracto antioxidante de nopal (*Opuntia ficus-indica*), como aditivo en el enfriamiento/congelación de semen, ha demostrado mejorar su calidad post-descongelado. Por lo anterior se considera que con su uso es factible disminuir el número de espermatozoides por dosis de semen en la I.A. sin afectar la fertilidad.

4 HIPOTESIS

La adición de extracto antioxidante de nopal durante el enfriamiento/congelación de semen de carnero, mejora la fertilidad de las dosis para I.A. con baja cantidad de espermatozoides.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la fertilidad posterior a la I.A. laparoscópica de ovejas, con dosis procesadas para congelar a baja cantidad de espermatozoides/dosis (50×10^6), incluyendo extracto antioxidante de nopal como aditivo.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la calidad biológica en el enfriamiento/descongelado de los espermatozoides.
- Evaluar la fertilidad de las ovejas por tratamiento experimental.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Bioética

Aprobación por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales con folio 04FCN2021.

6.2 Ubicación

El trabajo se realizó en:

Obtención y procesamiento de semen

La obtención y procesamiento de semen se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal, Unidad Amazcala, Facultad de Ciencias Naturales-Universidad Autónoma de Querétaro; 20°1' de latitud norte, 100°36' de longitud oeste, 1900 m sobre el nivel del mar, con temperatura y precipitación media anual de 15°C y de 570 mm.

Inseminación Artificial

El trabajo de Inseminación Artificial se realizó en 3 establecimientos: el primero fue en rancho Duraznito, camino El Rosario-Miranda, kilómetro 1.5, El Marqués, Querétaro; el segundo rancho HEAR, Camino Real #80, Ejido El Pueblito, Corregidora, Querétaro, sin número; el tercero Unidad de Producción Ovina Amazcala, Facultad de Ciencias Naturales-Universidad Autónoma de Querétaro, Amazcala, El Marqués Querétaro.

6.3 Población y muestra

Se utilizaron como donadores de semen tres carneros 1 de raza Katahdin y 2 de la raza Black Belly. En los 3 carneros la edad fue de 2 a 5 años, se encontraban clínicamente sanos, en buen estado nutricional (3 en escala de 1 a 5), con calificación de satisfactorio en la evaluación de capacidad reproductiva (Kimberling y Parsons, 2007) y antecedentes de fertilidad normal en condiciones de monta natural.

Se inseminaron 3 grupos de ovejas: el primero con 36 criollas (El Duraznito), el segundo con 28 de la raza Black Belly (Unidad Amzacala), el tercero con 29 de la raza Katahdin (HEAR).

6.4 Experimento

6.4.1 Obtención de extracto de nopal *Opuntia-ficus*

En cuanto a la elaboración del extracto acetónico de nopal, se obtuvieron las pencas de *Opuntia-ficus* de un grado de maduración uniforme, se lavaron y se cortaron en trozos pequeños para facilitar su secado. Se dividió el nopal picado en charolas, y se metieron en una estufa de secado convectivo a una temperatura de 55°C durante 72 horas hasta que el nopal perdió un 91.5% de peso (humedad). Posterior a esto, se trituro el nopal seco con una criba de 1 mm y el polvo obtenido se mezcló a razón de 5g con 100 ml de mezcla acetona/agua en una proporción 70:30, se mezcló a 700 rpm durante 96 horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se filtró la solución con papel filtro Watman No.4, luego se rotaevaporó la solución a 38°C hasta evaporar por completo la acetona del extracto y finalmente se liofilizó. Posteriormente, se retiraron las charolas de la liofilizadora y el extracto

se colocó en frascos color ámbar y se mantuvo en refrigeración a 5°C hasta su utilización (Olvera *et al.*, 2019).

6.4.2 Obtención del semen

Se colectaron eyaculados de los carneros seleccionados por medio de vagina artificial siguiendo los procedimientos establecidos en el Laboratorio de Reproducción Animal FCN-UAQ (García., 2018). (Figura 8). Para ser utilizado, cada eyaculado en lo individual debió tener ≥ 1.0 ml de volumen, concentración $\geq 2000 \times 10^6$ células/ml, ≥ 70 % de motilidad progresiva individual y < 10 % de anomalías totales.

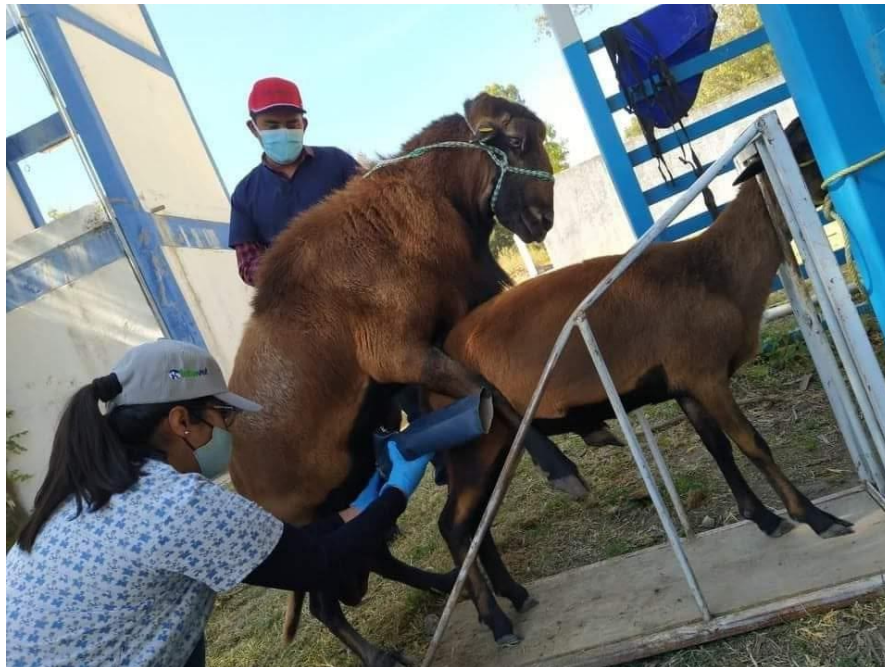


Figura 8. Colecta de semen de carnero con vagina artificial (Laboratorio de reproducción animal UAQ, 2021).

6.4.3 Procesamiento del semen

El diluyente/extensor para procesamiento fue en los 2 casos uno comercial (OPTIDYL, CRYO-VET). En el tratamiento control (T0) se adicionó únicamente el diluyente, al tratamiento experimental (T1) se le adicionó el diluyente con 0.5% de extracto antioxidante de nopal.

El proceso de extensión se realizó en un solo paso para lograr una concentración de 200×10^6 células espermáticas móviles/ml. El empaquetado se realizó en pajillas de 0.25 ml con 50 millones de espermatozoides móviles y fue sellado con alcohol polivinílico para después proceder al enfriamiento de 37 a 4 °C, en un tiempo de 4 h y posteriormente un tiempo de equilibrio de entre 18 a 20 h. Concluido el equilibrio se realizó la congelación por contacto con vapor de nitrógeno, 15 min a 5 cm del espejo de nitrógeno líquido en la cámara de congelación (Figura 9) y después las pajillas se transfirieron a nitrógeno líquido. La descongelación de pajillas y evaluación espermática post-descongelado se realizó 72 h después de permanecer en el nitrógeno líquido.



Figura 9. Pajillas de semen en el espejo de nitrógeno (Laboratorio de reproducción animal UAQ, 2021).

6.4.4 Manejo de los animales

Las hembras ovinas utilizadas en el experimento fueron I.A. a estro sincronizado. Para la sincronización del estro, 28 días antes de empezar con el experimento las ovejas fueron examinadas mediante ultrasonografía transrectal con un transductor lineal de 3.5 a 7.5 MHz (Figura 10), para verificar que no estuvieran gestantes (Figura 11).



Figura 10. Diagnóstico de gestación via Trans-Rectal en oveja .



Figura 11. Imagen ecográfica de placentoma en oveja .

Para la detección de estros, a partir de 24 horas posteriores al término del tratamiento de sincronización las ovejas fueron expuestas a un macho marcador; a las 8:00 AM, 12:00 PM Y 16:00 PM por periodos de una hora.

El criterio para determinar que una oveja presentaba estro fue la aceptación de la monta del macho marcador y a partir de esto se estableció la hora de mayor concentración de actividad estral para fijar la hora de I.A. Todas las ovejas identificadas en estro se mantuvieron 24h en ayuno de sólidos y líquidos previo a la I.A.

6.4.5 Sincronización del estro.

La sincronización del estro se llevó a cabo mediante la introducción de un dispositivo vaginal liberador de progesterona por 12 días (CIDR 300 mg, Zoetis) más 500 UI de gonadotropina coriónica equina, 24 horas posteriores al retiro del CIDR (ECEGON 5000, Biogénesis Bago).

6.4.6 Descongelado del semen

El descongelamiento del semen se realizó retirando la dosis a utilizar del termo de congelación de una manera rápida, posteriormente se depositó en un termo de descongelado que mantuvo en su interior agua a una temperatura de 36-37°C; El semen permaneció en el termo para su descongelado por un periodo mínimo de 30 segundos y máximo 3 minutos.

6.4.7 Inseminación artificial por laparoscopia

Para la realización de la IA por laparoscopia (Figura 12) (véase el anexo 1),



Figura 12. Inseminación artificial por laparoscopia en oveja (Unidad de producción animal, Amazcala UAQ, 2021).

6.4.8 Diagnóstico de gestación por ecografía

Para el diagnóstico de gestación por ecografía, se utilizó un ecógrafo (Chison serie Eco1), con un transductor lineal rectal multifrecuencia (3.5Mhz-7.5Mhz), donde se realizó un diagnóstico de gestación de manera trans-rectal a los 35 días posteriores a la inseminación Artificial (Figura 13).



Figura 13. Diagnóstico de gestación por ecografía 35 días posteriores a la IA (Rancho Hear, Querétaro, 2021).

6.5 Diseño experimental

Se utilizaron 109 ovejas de 3 unidades de producción (UP; Duraznitos- ovejas criollas; Hear, ovejas Katahdin; Amazcala, ovejas Black Belly), que se encontraban en un rango de edad de 1 a 8 años, la cual se evaluó mediante la inspección de la

formula dentaria y se categorizaron como ≤ 2 y > 2 años. Las ovejas se encontraban en buen estado nutricional, clínicamente sanas y con antecedentes de fertilidad normal. Se evaluó la condición corporal (CC) en una escala de 1 a 5 para obtener 2 grupos de animales, ≤ 2.5 y > 2.5 . Las ovejas fueron sincronizadas con un protocolo CIDR+ eCG, e I.A. por laparoscopia 24 h después de ser detectadas en estro por un macho celador; 93/109 ovejas presentaron estro sincronizado y fueron utilizadas en el experimento.

De manera aleatoria, los animales experimentales se asignaron a un Grupo Testigo (T0, n=47; I.A. con semen procesado utilizando un diluyente comercial, Optydil-CryoVet y 50×10^6 espermatozoides viables por dosis) o a un Grupo Tratado (T1, n=46; igual que el anterior, pero adicionando 0.5% de extracto antioxidante de nopal al diluyente). A los 35 días post servicio se realizó diagnóstico de gestación por ultrasonografía transrectal para determinar así la tasa de gestación como variable de respuesta.

6.6 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizaron 3 modelos incluyendo en cada uno el efecto de tratamiento (TRT) más el efecto de unidad de producción (MOD 1), categoría de edad (MOD 2) o categoría de CC (MOD 3); el método estadístico utilizado fue regresión logística con 2 factores y su interacción, usando LOGISTIC de SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Se estableció un valor de $P \leq 0.05$ como umbral de significancia estadística y un valor de $P > 0.05 \leq 0.1$ como indicador de tendencia.

7 RESULTADOS

7.1 Evaluación de la motilidad progresiva

En el proceso de **enfriamiento/congelado** del semen se observó en todos los sementales una mejora de la motilidad progresiva de los espermatozoides tratados con la adición de extracto antioxidante de nopal al 0.5%. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Motilidad progresiva de espermatozoides de carnero procesados usando un diluyente comercial (T0) o diluyente comercial adicionado con 0.5% de extracto antioxidante de nopal (T1).

	Semental		
	1 (ID 7653)	2 (ID 3250)	3 (ID 4348)
MP Enf			
T0	70%	60%	60%
T1	75%	65%	65%
MP Con			
T0	40%	40%	35%
T1	45%	45%	40%

MP Enf: Motilidad progresiva individual al término del enfriamiento. MP Con: Motilidad progresiva al descongela.

7.2 Sincronización del estro

Del protocolo de sincronización del estro, fueron sometidas 109 hembras, de las cuales 93 presentaron estro, esto equivale a 85.3% de éxito en el protocolo de sincronización.

7.3 Fertilidad de las ovejas

De un total de 93 ovejas inseminadas que representan el 100% de la muestra estudiada, resultaron 54 gestantes, representando una tasa de gestación de 58%. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tasa de gestación general por unidad de producción.

	Duraznitos	Hear	Amazcala	Total
Ovejas Inseminadas	36	29	28	93
Ovejas Gestantes	24	18	12	54
% Gestación	66.7	62.1	42.9	58.1

7.3.1 Fertilidad por tratamiento

Para el tratamiento T0 (semen procesado usando un diluyente comercial) la tasa de gestación fue 55.3% (26/47 ovejas) y en el (T1 (semen procesado usando un diluyente comercial adicionado con 0.5% de extracto antioxidante de nopal) fue 60.8% (28/46 ovejas) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tasa de gestión en ovejas inseminadas con semen procesado usando un diluyente comercial (T0) o un diluyente comercial adicionado con 5% de extracto antioxidante de nopal (T 1).

TRATAMIENTO	Tasa Gestación ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)
T0	26/47 (55.3%)
T1	28/46 (60.9%)

7.3.1 Fertilidad unidad de producción.

En el modelo que incluyó unidad de producción (UP; MOD1) se observó tendencia de efecto para la interacción TRT x UP (83 vs 50 %, 57 vs 67 % y 36 vs 50 % para T1 vs T0 en Duraznitos, Hear y Amazcala; P=0.07). Solamente en una de las unidades de producción hubo diferencia entre tratamientos, con una tasa de gestación mayor en el grupo en que se usó el aditivo antioxidante como parte del diluyente para procesar el semen (Duraznitos = 83 vs 50 % para T1 vs T0, P≤0.05) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Tasa de gestación por Unidad de Producción en ovejas inseminadas con semen procesado usando un diluyente comercial (T0) o un diluyente comercial adicionado con 5% de extracto antioxidante de nopal (T1).

	Duraznitos	Hear	Amazcala
T0 Ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)	9/18 (50.0)	10/15 (66.7)	7/14 (50.0)
T1 Ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)	15/18 (83.3)	8/14 (57.1)	5/14 (35.7)

7.3.3 Fertilidad por Edad

En el MOD2 que incluyo Edad se observó tendencia de efecto de categoría de edad como efecto principal (71% vs 52 % de tasa de gestación en ovejas ≤ 2 vs > 2 años; $P=0.07$), sin efecto de interacción con TRT. Las ovejas con ≤ 2 años de edad presentaron mayor tasa de gestación (Cuadro 10).

Cuadro 10 – Tasa de gestación en relación a la EDAD

	EDAD	
	≤ 2 años	> 2 años
Total ovejas gestantes	22 (71%)	32 (51.6%)
T0 Ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)	11 (50%)	15 (46.9%)
T 1 Ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)	11 (50%)	17 (53.1%)

7.3.4 Fertilidad por Condición Corporal (CC).

La CC no tuvo efecto sobre la tasa de gestación ni como efecto principal ni en su interacción con el efecto de TRT (46 vs 63 % para ≤ 2.5 vs > 2.5 puntos de CC; $P>0.10$).

(Cuadro 11).

Cuadro 11 – Tasa de gestaciones en relación a la Condición Corporal.

	Condición Corporal	
	≤2.5	>2.5
Total de ovejas gestantes	12 (46.1%)	42 (62.6%)
T0 Ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)	7 (58.3%)	19 (45.2%)
T 1 Ovejas Gestantes/ovejas inseminadas (%)	5 (41.7%)	23 (54.8%)

8 DISCUSIÓN

Durante el proceso de criopreservación del semen de carnero los espermatozoides son susceptibles a sufrir daños en su membrana plasmática desestabilizándola esto afectando su motilidad progresiva; la adición de 0.5% de extracto antioxidante de nopal mitiga estos efectos mejorando la motilidad progresiva (Allai *et al.*, 2016; Olvera *et al.*, 2019). Lo anterior, coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde la motilidad progresiva tanto posterior al enfriamiento como al congelado/descongelado, mejoró en todos los tratamientos donde se incluyó el extracto de nopal en comparación con el tratamiento control.

La estacionalidad reproductiva de las ovejas no fue un factor que influyera en los resultados del experimento, esto debido a que fueron sincronizadas mediante un protocolo de sincronización con CIDR+eCG, protocolo que también puede servir como inductor del estro/ovulación. Como resultado, se obtuvo una presentación de estros de 85.3%, lo cual resulta incluso ligeramente superior a lo reportado en otros estudios donde se emplearon protocolos de sincronización similares (Aké-López *et al.*, 2014; Espinoza-Martínez *et al.*, 2020).

La tasa general de gestación observada en el presente trabajo fue de 58 %, tasa que está cerca del límite superior (40% - 60%) de lo encontrado en I.A. laparoscópica con semen congelado en ovinos (Córdova-Izquierdo *et al.* 2008; Alvarez *et al.*, 2019); aunque la cantidad de espermatozoides por dosis fue menor a la que convencionalmente se utiliza (50×10^6 vs $80 - 100 \times 10^6$ células espermáticas). Lo anterior probablemente puede asociarse al trabajo minucioso que fue realizado durante todo el procesamiento de semen (colecta y criopreservación), la correcta aplicación del protocolo de sincronización, tiempo adecuado para

inseminación, características de las ovejas inseminadas, cálculo de espermatozoides por dosis considerando solo espermatozoides con motilidad progresiva y la pulcritud en la técnica de inseminación.

El efecto de interacción TRT x UP, observado para la tasa de gestación, pudo estar asociado a diferentes factores intrínsecos a cada UP. Sin embargo, un factor de suma importancia para tomar en cuenta es la diferencia de genotipos. Existen diferencias entre genotipos de hembras ovinas en relación con su fertilidad, lo cual en parte puede estar relacionado con sus grados de consanguinidad o heterosis (Palomera *et al.*, 2014). El grado de consanguinidad que tienen las ovejas de razas puras a diferencia de las criollas, tiene un efecto en el descenso de la fertilidad (Buratovich, 2010). En la Unidad de producción en que se observó efecto de tratamiento el genotipo era criollo (Duraznito), que en realidad es producto del cruzamiento de varias razas y seguramente con un alto nivel de heterosis.

La condición corporal (CC) se relaciona con el desempeño reproductivo, específicamente una condición corporal baja se asocia con un retraso o supresión de la presentación del estro. A su vez, también modifica el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria, las ovejas con buena condición corporal muestran una tasa de ovulación superior en comparación a las de condición corporal baja, además de una mayor tasa de fertilidad (Flores-Padilla *et al.*, 2017). La CC no tuvo efecto sobre la tasa de gestación ni como efecto principal ni en su interacción con el efecto de TRT (46 vs 63 % para ≤ 2.5 vs > 2.5 puntos de CC; $P > 0.10$). Lo anterior a diferencia de lo encontrado por otros autores (Aké-López *et al.*, 2013; Cervantes *et al.*, 2018). Sin embargo, en el presente estudio se encontró una aproximación con los resultados obtenidos por (Pastrana., 1984). Quien evaluó la fertilidad en ovejas, con CC DE 2

vs 3 puntos sin encontrar. El autor anterior, propone que los cambios en la fertilidad en relación con la CC se encuentran asociados solo a condiciones extremas (1 vs 5 puntos).

A lo largo de la vida de las ovejas la fertilidad es variable (Buratovich, 2010). La edad de la hembra ovina determina su fertilidad, con animales muy jóvenes o de edad avanzada presentando una disminución en este indicador. En el presente trabajo, las ovejas ≤ 2 años presentaron mayor fertilidad a la I.A., sin embargo, cabe resaltar que las ovejas de menor edad en este grupo fueron ovejas de 12 meses. Esto concuerda con un estudio realizado por Pérez *et al* (2019) quienes al probar la fertilidad en ovejas de diferentes edades encontró un porcentaje superior de gestaciones entre la edad de 12-18 meses.

9 CONCLUSIÓN

El uso de extracto antioxidante de nopal como aditivo en el proceso de criopreservación de semen ovino, muestra tener un efecto positivo sobre la fertilidad a la I.A. bajo algunas condiciones. Sin embargo, es de suma importancia continuar investigando este efecto para obtener conclusiones más firmes, controlando factores que además del semen utilizado influyen en la fertilidad de las hembras inseminadas. Cabe destacar que es posible obtener buenos porcentajes de fertilidad a la I.A. laparoscópica con semen congelado y baja cantidad de espermatozoides viables/dosis en ovejas. Lo antes mencionado, si se controlan factores como el proceso de criopreservación del semen, el protocolo de sincronización del estro, tiempo de servicio a la I.A., una correcta técnica por parte del inseminador y si se hace una adecuada selección de las hembras a servir.

10 BIBLIOGRAFÍA

Ahmadi, M. R., & Nazifi, S. (2006). Evaluation of reproductive status with cervical and uterine cytology in fat-tailed sheep. *Comparative Clinical Pathology*, 15(3), 161-164.

Aisen, E. G. 2004. Reproducción ovina y caprina. Primera edición. Editorial Intermédica. Reproducción Ovina Y Caprina.

Aké-López, J. R., Casanova-Estrella, G., Centurión-Castro, F. G., & Aké-Villanueva, J. R. (2013). Efecto de la condición corporal sobre la sincronización del estro, fertilidad y prolificidad de ovejas de pelo. *Bioagrobiencias*, 6(2), 34-38.

Aké-López, J. R., Centurión-Castro, F. G., Magaña-Monforte, J. G., & Aké-Villanueva, J. R. (2014). Efecto del progestágeno y de la dosis de gonadotropina coriónica equina en la sincronización del estro y tasa de gestación en ovejas Pelibuey inseminada por laparoscopia. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 261-268.

Allai L, Druart X, Öztürk M, BenMoula A, Nasser B & El Amiri B. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage *Anim. Reprod. Sci.* 2016; 175:1-9.

Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R.,... & Anel, L. (2019). Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 32-40.

Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., & Anel, L. (2019). Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 32-40.

AMCO. Asociación Mexicana de criadores de ovinos. (2007). Catálogo de razas. Melchor Ocampo No. 405-202, Col. Nueva Anzures, C.P. 1159, México D.F.

Arroyo, J. (2011). Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(3), 829-845.

Arroyo-Ledezma, J., La Torre-Barrera, D., & Ávila-Serrano, N. Y. (2013). Respuesta reproductiva de ovejas de pelo sincronizadas con progesterona o prostaglandinas. *Agrociencia*, *47*(7), 661-670.

Bartlewski, P. M., Baby, T. E., & Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* *124*(3-4), 259-268.

Bidinost, F., Gibbons, A. E., Cueto, M., & Norte, M. P. (1999). Ecografía para el diagnóstico de preñez en ovinos y caprinos. INTAEEA Bariloche Macroregión Patagonia Norte.

Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J. L., Hernández, J., Páramo, M., Zarco, L., & Valencia, J. (2018). Fisiología reproductiva de los animales domésticos. *México: FMVZ-UNAM*.

Buratovich, O. (2010). Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte II: otros factores no nutricionales. Sitio Argentino de Producción Animal [www. Produccion-animal. Com. ar](http://www.Produccion-animal.com.ar).

Cardozo, J. A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, *66*(4), 841-850.

Cerón, J. H., Méndez, J. V., & Quintero, L. Z. (2001). Regresión del cuerpo lúteo y presentación del estro en ovejas con dos inyecciones de prostaglandina con 8 días de intervalo. *Técnica Pecuaria en México*, *39*(1), 53-57.

Cervantes, S. M. H. (2018). Condición corporal sobre algunos parámetros reproductivos en borregas criollas del distrito de lamay, provincia de calca-cusco. *Revista de Investigaciones de la Escuela de Posgrado de la UNA PUNO*, *7*(3).

Córdova-Izquierdo, A., Córdova-Jiménez, M. S., Córdova-Jiménez, C. A., & Guerra-Liera, J. E. (2008). Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria*, *19*(1), 67-79.

Cseh, S., Faigl, V., & Amiridis, G. S. (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130(3-4), 187-192.

Dávila, F. S., Rivas, G. P., & Torres, R. A. L. (2013). Diagnóstico de gestación temprana por medio de ultrasonografía en ovejas de pelo. *Ciencia UANL* 60: 78-84.

Donovan, A., Hanrahan, J. P., Lally, T., Boland, M., Byrne, G. P., Duffy, P., & O'Neill, D. J. (2001). AI For Sheep Using Frozen-thawed Semen. Teagasc.

Espinosa-Martínez, M., Montiel-Olguín, L., Villaseñor-González, F., & Jiménez-Severiano, H. (2020). Sincronización de estros en ovejas Pelibuey utilizando CIDR y diferentes dosis de eCG. *Abanico veterinario*, 10.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. (2016) producción de carne de ovino en el mundo. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#search/carne%20de%20ovino>. Consultado [22/11/20].

Flores-Padilla, J. P., Toscano-Torres, I. A., Núñez-Anita, R. E., Tena-Martínez, M. J., Val-Arreola, D., & Olivo Zepeda, I. B. (2017). Evaluación de la utilización de semen congelado y refrigerado en la inseminación artificial por laparoscopia en la especie ovina evaluation of the use of frozen and refrigerated semen in laparoscopic artificial insemination in sheep. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal AICA*, 9, 41-47.

Galina, C., Valencia, J., Bayard, P., Becerril, J., Bo, G., Boeta, M., & Zarco, L. (2008). Reproducción de animales domésticos.

García, H. (2018). Manual de prácticas de colecta y procesamiento de semen ovino Condición corporal, Centro Universitario Querétaro, Qro.

Gibbons, A., & Cueto, M. (1995). Manual de inseminación artificial en la especie ovina. INTA Bariloche.

González, J. B. (2020). Efecto de la solución salina ozonizada sobre la migración de neutrófilos polimorfonucleares en el útero y la endometritis subclínica. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

Hafez, E. S. F & Hafez, B. S. (2000). Reproducción e inseminación en animales 7ª ed. McGraw-Hill. EE.UU.

Kimberling C.V & G.A. Parson. 2007. Breeding soundness evaluation and surgical sterilization of the ram. In: Current therapy in large animal theriogenology. (2ª Ed.) Saunder Elsevier USA, PP 20-628.

Luna Palomera, C., & Alonso Morales, R. A. (2014). Genes con efecto mayor sobre la fertilidad de ovejas: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5(1), 107-130.

Martínez-González, E. G., Muñoz-Rodríguez, M., García-Muñiz, J. G., Santoyo-Cortés, V. H., Altamirano-Cárdenas, J. R., & Romero-Márquez, C. (2011). El fomento de la ovinocultura familiar en México mediante subsidios en activos: lecciones aprendidas. *Agronomía mesoamericana*, 22(2), 367-377.

Martínez-Ros, P., & González-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9(4), 146.

Maxwell, W. M. C., & Watson, P. F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 55-65.

Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Vaseghi Dodaran H & García-Álvarez O. Effect of Green tea (*Camelia sinensis*) extract and prefreezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 2016; 73(3):297-303.

Olvera, O., Ferriz, R., Montiel, J., Jiménez, H., Pérez, E., Gómez, J., & Vera, H. (2019). Uso de extracto acetónico de nopal (*Opuntia ficus*. *Copena F1*) como aditivo en la congelación de semen de ovino. *Rev. Acad. Cien. Anim.* 17: 385-387.

Pastrana, R. (1984). *Efecto del peso, volúmen y condición corporal sobre la tasa reproductiva de las ovejas..* Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/22452>

Peña, A. I., de Pablo, C. D., Herradón, P. J. G., González, J. J. B., & Arias, L. A. Q. (1999). Diagnóstico precoz de gestación por ecografía transrectal en la oveja. *Archivos de zootecnia*, *48*(181), 13-20.

Pérez, E., Gutierrez, J., Lavín, P., & Mantecón, Á. R. (2019). Factores condicionantes de la fertilidad en inseminación artificial en ovejas de raza Assaf Española: edad a la inseminación, días postparto, producción de leche y concentración de urea en leche.

Petrovic, Milan & Caro Petrović, Violeta & Ruzic-Muslic, D. & Maksimovic, Nevena & Ilić, Zoran & Milosevic, B. & Stojkovic, J.. (2012). Some important factors affecting fertility in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 28. 517-528. 10.2298/BAH1203517P.

Plant, t. m., & Zeleznik, a. j. (Eds.). (2014). *knobil and neill's physiology of reproduction*. Academic press.

Prieto, M., García Martínez, G., Lateulade, I., & Villa, M. (2011). Sincronización de celos en ovinos con doble dosis de prostaglandina. *Rev Ganadería*. 39: 175-8.

Quintela, L. A., Diaz, C., Becerra, J., & Herradon, P. G. (1999). Early pregnancy diagnostic by transrectal ultrasonography in the ewe. *archivos de zootecnia*, *48*, 13-20.

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reprod. Sci.* 37(3-4), 185-249.

Sharkey, S., Callan, R. J., Mortimer, R., & Kimberling, C. (2001). Reproductive techniques in sheep. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *17*(2), 435-55.

SIAP. Secretaria de información agroalimentaria y pesquera. (2019). Producción ganadera. México. Obtenido de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>. Consultado [22/09/20].

TOSU. The Ohio State University. (2017) Management Factors Afectting Sheep Fertility. Obtenido de <https://u.osu.edu/talkingsheep/2017/09/06/management-factors-affecting-sheep-fertility/>. Consultado [18/08/22].

Uribe-Velásquez, L. F., Correa-Orozco, A., & Osorio, J. H. (2009). Characteristics of ovarian follicle development during estrous cycle in sheep. *Biosalud*, 8(1), 117-131,

Uribe-Velásquez, L. F., Oba, E., & Souza, M. I. L. (2007). Respuesta endocrina y ovárica a la sincronización del estro y de la ovulación utilizando CIDR y eCG en ovejas. *Vet. Zootec*, 9, 7.

Vargas, M. X. (2019). Evaluación del plasma seminal etéreo específico (bovino a ovino). Sobre la congelabilidad de semen de carnero. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

ANEXO 1

Inseminación artificial por laparoscopia

1. Las ovejas fueron sometidas a un método de contención química mediante la aplicación de xilacina al 2% vía IM, usando una dosis de .6-1 ml dependiente al tamaño.
2. Se colocó la oveja en decúbito dorsal sobre una camilla, los miembros con unos arneses, posteriormente se inclinó la camilla en un ángulo de 45° dejando la cabeza abajo y el tren posterior arriba.
3. Se esquiló la zona ubicada delante de la ubre (una palma de distancia posterior a la ubre).
4. Se rasuró la misma zona.
5. Se realizó antisepsia (yodo) sobre la piel del área rasurada.
6. Se perforó con un trocar (7 mm) la pared abdominal del lado izquierdo y el omento mayor para acceder a la cavidad abdominal.
7. Se administró aire con el compresor mediante el trocar (7 mm) para poder inflar la cavidad abdominal y obtener una mejor visibilidad.
8. Se introdujo el laparoscopio para identificar los cuernos uterinos.
9. Se perforó la cavidad abdominal con el segundo trocar (5 mm) del lado derecho.
10. Mediante el segundo trocar (5mm) se introdujo el áspic de inseminación, este también cumplió con la función de retirar del campo visual el omento y otros tejidos.
11. Se exteriorizó la aguja del áspic de inseminación para poder perforar de manera rápida y en ángulo de 90° el cuerno uterino (figura 14), se confirmó que el instrumento estuviera dentro de la luz del cuerno uterino.

12. Se descargó la dosis de semen.
13. Se retiraron los instrumentos y se liberó el gas del abdomen.
14. Se colocó un antiséptico en el área abdominal de la oveja.
15. Se liberó el animal de la camilla.

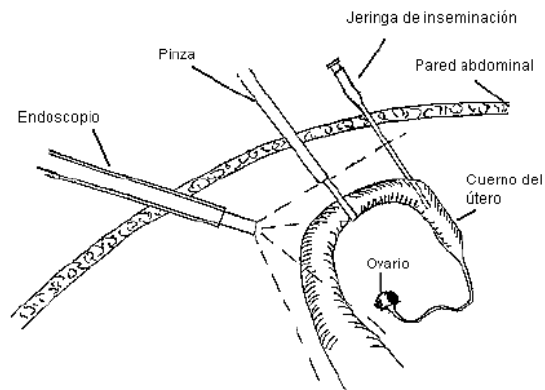


Figura 14. Perforación de cuerno uterino para la deposición de semen (Gibbons *et al.*, 1995.)