

Incubación de semen post-eyaculación como método para alterar la proporción de sexos de las crías producto de la inseminación artificial en conejas

A. Trejo¹, V.M. Meza Villalvazo, S. Ramírez Ordoñez, C.M.A. Cisneros, A. Villa Mancera²

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, Universidad del Papaloapan, Loma Bonita, Oax., México
Recibido Febrero 09, 2013. Aceptado Agosto 11, 2013.

Post-ejaculation incubation of semen as a method to alter the sex ratio of offspring obtained by artificial insemination in rabbits

Abstract. In mammals, the sex ratio under natural conditions is 50% female and 50% male. However, this ratio can be altered by some methods. The application of warmth (42°C) to the scrotum has an effect on the functioning of spermatozoa within the epididymis and modifies the sex ratio of offspring obtained through natural mating. The aim of this study was to determine the effect of post-ejaculation incubation temperature (42°C or 30°C) on the sex ratio of offspring obtained by artificial insemination. Each ejaculate was diluted and divided into two equal aliquots (0.5mL), one of which was incubated at 42°C and the other at 37°C for 30min. The sperm motility and viability at 42°C was 87.3% and 89.4%, and at 37°C, 88.2 and 75.5%, respectively. When artificial insemination was performed using semen incubated at 42°C and 37°C, 6.38, and 7.83 conies were born per litter, respectively. The sex ratio of offspring when sperm was incubated at 42°C was 56.2% females and 43.7% males, while for semen incubated at 37°C it was 52.6% females and 47.4% males. In conclusion, incubation of semen post ejaculation at 42°C during 30 min could be used to favor the birth of female offspring through artificial insemination.

Key words: Motility, Rabbits, Semen, Sex Ratio, Temperature,

Resumen. En mamíferos, la proporción de sexos bajo condiciones naturales es de 50% hembras y 50% machos. Sin embargo, esta proporción puede alterarse mediante algunos métodos. La aplicación de aumentada temperatura (42°C) a nivel del escroto tiene un efecto sobre la función de los espermatozoides presentes en el epidídimo y modifica la proporción de sexos de las crías obtenidas a través de monta natural. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la temperatura de incubación del semen post-eyaculación (42°C o 30°C) sobre la proporción de sexos de las crías obtenidas por inseminación artificial. Cada eyaculado fue diluido y dividido en dos alícuotas de igual volumen (0.5 mL), una muestra fue incubada a 42°C y la otra a 37°C, ambas durante 30 min. La movilidad y viabilidad espermática a 42°C fue 87.3 y 89.4% y a 37°C, 88.2 y 75.5%, respectivamente. Al realizar la inseminación artificial de conejas utilizando el semen incubado a 42°C y 37°C se obtuvieron 6.38 y 7.83 gazapos por camada, respectivamente. La proporción de sexos de las crías al utilizar semen a 42°C fue 56.2% hembras y 43.7% machos y para semen incubado a 37°C fue 52,6% hembras y 47,4% machos. En conclusión, la incubación post-eyaculación a 42°C durante 30 min podría servir como método para favorecer el nacimiento de hembras a través de la inseminación artificial.

Palabras clave: Conejos, Movilidad, Proporción de Sexos, Semen, Temperatura

¹Autor para la correspondencia, e-mail: atrejo@unpa.edu.mx

²Laboratorio de Reproducción y Genética, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

Introducción

La proporción de sexos se define como la relación entre machos y hembras en una población, bajo condiciones naturales. Se ha establecido que ésta debe ser 1:1, es decir 50% hembras y 50% machos (Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 1998). En mamíferos, los mecanismos involucrados en la determinación del sexo se clasifican en dos grupos, los que ocurren antes y los que ocurren después del momento de la fecundación (Jiménez *et al.*, 2003). El mecanismo responsable de la determinación del sexo antes de la fecundación se basa en la existencia de diferencias entre espermatozoides portadores de un cromosoma X o Y (Hardy, 1997). Se ha propuesto la existencia de diferencias en el patrón de movilidad entre espermatozoides X y Y; sin embargo, esta variación no ha sido exclusiva de un tipo de espermatozoide (Pérez-Crespo *et al.*, 2008).

El poder modificar la proporción de sexos de las crías es de gran interés desde un punto de vista productivo, ya que, tanto en los sistemas productores de bovinos de leche como en los destinados a producir carne, el sexo de la descendencia condiciona su productividad (Ruvuna *et al.*, 1992). A pesar de que existen evidencias de un efecto in vivo de temperaturas elevadas sobre la proporción de sexos de las crías (Pérez-Crespo *et al.*, 2008), no existen trabajos que evalúen el uso de la incubación post-eyaculación antes de la inseminación artificial y su efecto sobre la proporción de sexos de las crías. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue conocer la proporción de sexos de las crías obtenidas por inseminación artificial, en conejas, utilizando semen incubado a 42°C o 37°C durante 30 min.

Materiales y Métodos

Localización

La presente investigación se llevó a cabo en la granja «La Posta», de la Universidad del Papaloapan, Campus Loma Bonita, ubicada en el estado de Oaxaca, México, entre las siguientes coordenadas: latitud 18° 10' a 17° 46' N y longitud 95° 47' a 95° 59' O. La altitud es de 25 msnm, la precipitación media de 1500 mm y la temperatura media anual de 25°C (INEGI, 2011).

Animales

Se utilizaron 30 conejas y 3 machos de la raza Nueva Zelanda, de 4-5 meses de edad, con un peso promedio de 2.4kg. Fueron alimentados con concentrado Purina® y agua a libre acceso. Los animales fueron tratados siguiendo las normas de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (1996).

Eyaculados

Se obtuvieron 15 eyaculados de conejo (5 eyaculados de cada macho) a través de vagina artificial cuya temperatura fue de 40°C). El periodo de obtención de los eyaculados fue de 15 d, siendo cada macho trabajado dos veces por semana (lunes y viernes). Una vez obtenido el eyaculado, éste fue diluido en medio Brackett-Oliphant (Brackett y Oliphant, 1975) a una concentración de 30×10^6 espermatozoides por mL.

Efecto de la incubación del semen sobre la movilidad espermática

Después de la dilución, cada eyaculado fue separado en dos alícuotas. Una muestra fue incubada durante 30 min a una temperatura de 42°C,

mientras que la otra fue incubada durante 30 min a 37°C. Después del tiempo de incubación se tomó 5µl de cada muestra para realizar la determinación de la movilidad y viabilidad post-incubación. El resto de la muestra fue mantenida a la temperatura correspondiente (42°C y 37°C) hasta la realización de la inseminación artificial.

Evaluación de la movilidad progresiva

Para la determinación de este valor se tomó una gota del eyaculado diluido, se colocó sobre una lámina portaobjetos y se evaluó directamente bajo el microscopio a 40X, registrando el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva.

Evaluación de la viabilidad

Para determinar la viabilidad espermática se realizó el siguiente procedimiento: 5µL de la muestra se colocó en un portaobjetos, se adicionó 5µL de una solución de Eosina (1%) y Nigrosina (5%). Se homogeneizó y se realizó un extendido, luego se colocó sobre la platina térmica hasta su secado, después se observó en el microscopio a 40X contando 100 espermatozoides, registrando el porcentaje de vivos y muertos (los espermatozoides muertos presentan una tinción en la región de la cabeza).

Proporción de sexos de las crías obtenidas por inseminación artificial utilizando semen incubado a 42°C y a 37°C.

Sincronización de estros. La sincronización de estros se realizó mediante la aplicación de 25 UI de eCG (Folligon®, Intervet) 48 h antes de la inseminación (Sakr *et al.*, 2012).

Inseminación artificial

Inmediatamente después del periodo de incubación se realizó la inseminación artificial, a 30 conejas de la raza Nueva Zelanda, divididas de manera aleatoria en dos grupos, T42 y T37 (ambos n = 15) inseminadas con semen incubado a 42°C y 37°C. La inseminación artificial se realizó siguiendo la técnica propuesta por Morrell (1995), utilizando una dosis de 30 x 10⁶ espermatozoides/mL. Después de realizada la inseminación artificial se aplicó una dosis de 20 µg (0.2mL) de GnRH para inducir la ovulación

(Fetagyl®, Intervet). Al ocurrir los partos se determinó el tiempo de gestación, el número de gazapos por camada y el sexo de las crías.

Análisis estadístico

Para comparar las características (movilidad y viabilidad) espermáticas en los eyaculados se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey (con P<0.05). Para comparar la proporción de sexos de las crías nacidas por inseminación artificial se utilizó la prueba de ji-cuadrado empleando el programa SPSS versión 10.

Resultados

En el Cuadro 1, se resumen el volumen y las características espermáticas observadas en los 15 eyaculados de conejo obtenidos.

En el Cuadro 2, se muestran los valores de movilidad y viabilidad espermáticas en eyaculados frescos, después de la dilución, y luego de incubados a 42°C y a 37°C. No se encontraron diferencias significativas (P>0.05) en la movilidad y viabilidad espermáticas cuando se realizó la dilución, o cuando los eyaculados fueron incubados a las dos temperaturas evaluadas.

En el Cuadro 3, se muestran los resultados obtenidos en los partos de conejas inseminadas con semen de los tratamientos T42 y T37. Se observó un efecto significativo de la temperatura de incubación sobre el número de gazapos por camada desfavorable al uso de semen incubado a 42°C (P<0.05). En cuanto a la duración de la gestación, no se observó efecto de los tratamientos, pero en la proporción de sexos de las crías, se observa una diferencia significativa en el porcentaje de hembras obtenidas cuando se utilizó semen incubado a 42°C (P<0.05).

Cuadro 1. Promedio (± desviación estándar) de volumen y características espermáticas de los eyaculados

Número de eyaculados (n)	Volumen (mL)	Concetración (x10 ⁶ /mL)	Movilidad (%)	Viabilidad (%)
15	0.83 ± 0.23	475.23 ± 77.6	87.3	89.4

Cuadro 2. Promedio (± desviación estándar) de la movilidad y viabilidad espermática bajo diferentes condiciones

Característica	Eyaculados			
	Fresco	Diluido	Incubación 42°C	Incubación 37°C
Movilidad	87.3 ± 1.03	87.0 ± 1.6	86.7 ± 0.93	86.9 ± 1.02
Viabilidad	89.4 ± 1.84	88.9 ± 1.5	88.7 ± 1.23	89.0 ± 0.94

Cuadro 3. Tamaño de la camada, duración de la gestación y proporción de sexos de las crías obtenidas a través de inseminación artificial utilizando semen incubado a 42°C y a 37°C.

Tratamineto	Conejas madres	Gazapos/camada (n)	Duración de la gestación (días)	Proporción de sexos de las crías	
				Hembras (%)	Machos (%)
T42	15	6.38 ± 1.03 ^a	30.5	56.2 ^a	43.7 ^b
T37	15	7.83 ± 1.43 ^b	30.0	52.6 ^a	47.4 ^a

^{a,b}Letra diferente en una misma columna indica diferencia estadística significativa (P<0.05).

Discusión

Los eyaculados tuvieron un volumen promedio de 0.83 mL, valor este que está dentro del rango para esta especie (0.3 a 1.0 mL), encontrado por Alvariño, (1993). La movilidad espermática progresiva en eyaculados frescos fue de 87,3%, siendo este valor superior a lo informado por Mathur *et al.* (1988) y Hernández *et al.* (2008) en eyaculados de este tipo (63.4 y 82.72%, respectivamente). En relación a la movilidad, Alvariño (1993) determinó que un eyaculado de buena calidad debe tener entre 60 a 70% de espermatozoides móviles.

Con respecto al diluyente, el medio Brackett-Oliphant ha sido ampliamente utilizado en trabajos relacionados con espermatozoides de carnero (Saravia *et al.*, 2007), bovino (Chandler *et al.*, 1999), y cerdo (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001). En el presente trabajo, el medio Brackett-Oliphant permitió mantener la movilidad espermática sin cambios significativos después de la dilución y aun después de la incubación, tanto a 42°C como a 37°C. Estos resultados coinciden con los de Chandler *et al.* (1999), quienes determinaron que tras diluir semen de bovino en medio Brackett-Oliphant a 37°C se mantenía la movilidad espermática sin cambios hasta por 3h post-dilución.

Los resultados de este estudio indican que la incubación de los eyaculados a una temperatura de 42°C durante 30min, no tiene un efecto significativo sobre la movilidad y viabilidad espermática (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con Pérez-Crespo *et al.* (2008), en que los espermatozoides de ratón obtenidos a partir de machos sometidos a estrés calórico (42°C) a nivel del escroto, mantienen, sin cambios significativos, la movilidad y viabilidad. La peroxidación de lípidos es un proceso que ocurre durante el almacenamiento tanto *in vivo* como *in vitro* y está relacionado con la disminución de la movilidad espermática. Es posible que a la temperatura de 42°C la tasa de peroxidación de lípidos sea mínima y por este motivo no se vean afectados los parámetros funcionales de los

espermatozoides. A este respecto, Zukiene *et al.* (2010) evaluaron el efecto de una temperatura superior a los 40°C en el funcionamiento de las mitocondrias, observando que a una temperatura de 40-42°C se disminuye ligeramente el potencial de membrana y se inicia el proceso de fosforilación oxidativa, lo cual afecta la movilidad y viabilidad espermática.

En cuanto al tamaño de la camada, se obtuvo un promedio de 7.83 gazapos cuando se utilizó eyaculados incubados a 37°C. Este valor es ligeramente superior a lo informado por El-Sherbieny *et al.* (2012) de 6.1 gazapos y por Ponce de León *et al.* (2003) de 6,08 gazapos por camada, en conejos Nueva Zelanda. Al realizar la inseminación artificial, utilizando los eyaculados incubados a 42°C, se observó una disminución significativa ($P<0.05$) en el tamaño de la camada (6.8 gazapos por camada). De acuerdo a lo establecido por varios autores (Koefoed-Johnson *et al.*, 1971; Pérez-Crespo *et al.*, 2008; Hansen, 2009), la incubación de espermatozoides causa un incremento en la mortalidad embrionaria; esto podría ser la causa de la disminución observada en el número de gazapos obtenidos con semen sometido a estrés calórico en el presente caso.

Al realizar la inseminación artificial con semen incubado a 42°C y analizar la proporción de sexos de las crías, se obtuvo una variación significativa ($P<0.05$) a favor de las hembras (56.2%), mientras que con semen incubado a 37°C no hubo variación significativa. Este incremento en el número de hembras nacidas podría relacionarse con las diferencias funcionales entre espermatozoides X y Y, como lo señalan Pérez-Crespo *et al.* (2008), 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.

Conclusión

La incubación post-eyaculación a 42°C por un periodo de 30 min puede ser utilizada como estrategia para alterar la proporción de sexos en las camadas de conejas, mediante la técnica de inseminación artificial. A pesar de observar un cambio significativo a favor del nacimiento de

hembras, se requiere realizar estudios a través de un sistema computarizado (CASA) para determinar el efecto de la incubación post-eyaculación en la movilidad espermática, con el objeto de determinar si existen poblaciones de espermatozoides cuya movilidad se afecte más.

Literatura Citada

- Alvariño, M. R. 1993. Control de la reproducción en el conejo. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. p. 65.
- Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 2:260-274.
- Chandler J.E., S.D. Degelos, A.M. Canal and J.B. Paul. 1999. A technique for the evaluation of sperm penetrating ability and quality of bovine semen processed in an extender made with Brackett-Oliphant medium and egg yolk. Theriogenology 51:1467-1476.
- El-Sherbieny, M. A., Z. M. Kalaba, E. M. E. El-Siefy and R. A. Ayat. 2012. Freezing and fertilizing capacity of frozen rabbit semen extended with gelatin addition. Asian J. Anim. Sci. 6:291-299.
- Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C.
- Hardy, I. C. W. 1997. Possible factors influencing vertebrate sex ratio: an introductory overview. Appl. Anim. Behav. Sci. 51:217-241.
- Hansen, P.J. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Phil. Trans. R. Soc. B. 364:3341-3350.
- Hernández, P. J. E., R. F. Fernández, C. J. Reyes, P. G. Cerezo, J. L. Echegaray y B. Mendoza. 2008. Separación de espermatozoides «Y» de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albúmina sérica humana. Rev. Salud Anim. 30:45-49.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011. Carta Hidrológica y Climática del estado de Oaxaca. (<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/info/oax/m044/anexos/introd.htm>)
- Jimenez, A., N. Madrid-Bury, R. Fernandez, S. Perez-Garnelo, P. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente and A. Gutierrez-Adan. 2003. Hyperglycemia induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. Mol. Reprod. Dev. 65:180-187.
- Koefoed-Johnson, H. H., A. Pavlok, and J. Fulka. 1971. The influence of the ageing of spermatozoa *in vitro* on fertilizing capacity and embryonic mortality. J. Reprod. Fert. 26:351-356.
- Mathur, A. K., R. S. Srivastava and J. Anil. 1988. Effect of pH and temperature on *in vitro* preservability of rabbit semen. Indian J. Anim. Sci. 62:144-146.
- Morrell, J. M. 1995. Artificial insemination in rabbits. Br. Vet. J. 151:477-488.
- Pérez-Crespo, M., B. Pintado and A. Gutierrez-Adan. 2008. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. Mol. Reprod. Dev. 45:40-47.
- Ponce de León, R., G. Guzmán, M. E. Quezada, M. Mora y M. Flebes. 2003. Reproducción comparativa de razas puras de conejos en condiciones comerciales. Rev. Cubana Cienc. Agric. 37: 343-351.
- Rodríguez-Martínez, H., P. Tienthai, K. Suzuki, H. Funahashi, H. Ekwall and A. Johannisson. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. Reprod. (Suppl. 58):129.
- Ruvuna, F., J. F. Taylor, J. P. Walter, J. W. Turner and R. M. Thallman. 1992. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: I. Description of a biological model for steer production. J. Anim. Sci. 70:1091-1097.
- Sakr, O. G., R. M. García-García, M. Arias-Álvarez, P. L. Lorenzo, P. Millán, B. Velasco y P. G. Rebollar. 2012. Métodos para sincronización de celo en conejas primíparas lactantes a 25 días post-parto. Rev. Complutense Cienc. Vet. 6:6-13.
- Saravia, F., M. Hernández, M. Wallgren, A. Johannisson and H. Rodríguez-Martínez. 2007. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. Int. J. Androl. 30:485-499.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A. M., B. J. Aerts, and J. H. den Daas. 1998. Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. Theriogenology. 53:575-597.
- Zukiene, R., Z. Nauciene, J. Ciapaite, and V. Mildaziene. 2010. Acute temperature resistance threshold in heart mitochondria: Febrile temperature activates function but exceeding it collapses the membrane barrier. Int. J. Hyperthermia 26:56-66.