

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**COMPARACIÓN DE LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* Y CAPACIDAD
FERTILIZANTE *IN VIVO* DEL SEMEN DE CONEJO REFRIGERADO CON DOS
DILUYENTES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

MVZ. MARCELA HÉRNANDEZ RAMÍREZ

DIRECTOR

DR. JUAN GABRIEL RIVERA MARTÍNEZ

ASESORES

DR. JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGÁN

DRA. YAZMIN ELIZABETH FELIPE PÉREZ

Ciudad de México., Diciembre de 2016

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR:

Dr. Juan Gabriel Rivera Martínez

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Departamento de Biología de la Reproducción.
Correo electrónico: rmjg@xanum.uam.mx
UAM-Iztapalapa

ASESORES:

Dr. José Antonio Herrera Barragán

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Departamento de Producción Agrícola y Animal.
Correo electrónico: jherrerab@correo.xoc.uam.mx
UAM-Xochimilco

Dra. Yazmín Elizabeth Felipe Pérez

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Departamento de Reproducción Animal.
Correo electrónico: yefelipep@uaemex.mx
UAEMEX

JURADO DE EXAMEN

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Adscripción: División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Correo electrónico: jherrerab@correo.xoc.uam.mx

Dra. Yazmín Elizabeth Felipe Pérez

Adscripción: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Departamento de Reproducción Animal.

Universidad Autónoma del Estado de México.

Correo electrónico: yfelipep@uaemex.mx

Dra. Edith Arenas Ríos

Adscripción: Departamento de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: editharenas2000@yahoo.com.mx

Dra. Irma Jiménez Morales

Adscripción: Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: irmalety66@gmail.com

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797”

Durante los estudios realizados, se contó con apoyo de beca CONACyT (Número de CVU 622273)

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: **“COMPARACIÓN DE LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* Y CAPACIDAD FERTILIZANTE *IN VIVO* DEL SEMEN DE CONEJO REFRIGERADO CON DOS DILUYENTES”** que presentó Marcela Hernández Ramírez el día 13 de Diciembre del 2016.



PRESIDENTE

Dr. José Antonio Herrera Barragán
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco



SECRETARIO

Dra. Yazmín Elizabeth Felipe Pérez
Departamento de Reproducción Animal
Universidad Autónoma del Estado de México



VOCAL

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



VOCAL

Dra. Irma Jiménez Morales
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0004

México 214260755

COMPARACIÓN DE LA
CONSERVACIÓN *in vitro* Y
CAPACIDAD FERTILIZANTE *in vivo*
DEL SEMEN DE CONEJO
REFRIGERADO CON DOS
DILUYENTES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD DE ESTUDIOS ESCOLARES
UNIDAD DE ESTUDIOS ESCOLARES
LAPA

02 ENE 2017

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES



Marcela R.

MARCELA HERNANDEZ RAMIREZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:30 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DRA. EDITH ARENAS RIOS
DRA. YAZMIN ELIZABETH FELIPE PEREZ

En la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuyo denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: MARCELA HERNANDEZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

[Signature]

DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

VOCAL

[Signature]

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

[Signature]

DRA. EDITH ARENAS RIOS

SECRETARIA

[Signature]

DRA. YAZMIN ELIZABETH FELIPE PEREZ

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme guiado por el camino correcto, hasta llegar a la meta y por brindarme conocimiento y comprensión para poder culminar con éxito éste grado académico.

A mis padres

Por ser para mí un apoyo constante en todos los aspectos, por hacerme valorar cada una de las oportunidades que tengo a mi alcance, por la forma de educarme y construir las bases sobre las que edifico mi vida, la cual completa hoy un paso más al concluir esta etapa de mi vida

A mi hermana

Por todos los momentos que hemos compartido. Por ser mi alegría, mi apoyo y por darme todo su cariño.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción (R-016) de la UAM-Iztapalapa y fue apoyado por CONACYT, México.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme abierto las puertas y permitirme ser parte de ella.

Al Dr. Juan Gabriel Rivera Martínez, por su esfuerzo y dedicación; quien con sus conocimientos, experiencia y motivación, ha permitido la culminación exitosa de este proyecto. Quien más que mi tutor, ha sido mi amigo a quien agradezco el tiempo, consejos, comprensión y oportunidades brindadas.

A mis asesores, el Dr. José Antonio Herrera Barragán y la Dra. Yazmín Elizabeth Felipe Pérez, por su cooperación técnica en la investigación, la cual fue valiosa y trascendental

Con agradecimiento a la Dra. Rosario Campos Hernández por su apoyo técnico, personal e incondicional y por brindarme su amistad y consejos enriquecedores en todos los aspectos.

Con agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado y brindado apoyo técnico e incondicional hacia la formación científica.

Con agradecimiento a mis profesores de la maestría, quienes me brindaron de forma única apoyo técnico en mi formación académica.

A mi amigo Alfredo que, sin duda fue parte importante para embarcarme en esta compleja, pero muy importante y gratificante etapa de mi vida.

A mis amigos, por regalarme momentos inolvidables a lo largo de esta etapa de mi vida, por estar siempre ahí, en los buenos y malos momentos. Pero sobre todo por regalarme su amistad incondicional

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	4
2.1 Anatomía del aparato reproductor de la hembra	4
2.1.1 Madurez sexual	5
2.1.2 Comportamiento sexual	6
2.1.3 Fisiología reproductiva	7
2.1.4 Fisiología ovárica	8
2.1.4.1 El ovocito.....	8
2.1.4.2 Ovogénesis	9
2.1.4.3 Foliculogénesis	10
2.1.4.4 Maduración del ovocito	11
2.1.4.6 Ovulación	12
2.2. Anatomía del aparato reproductor del macho	13
2.2.1 Madurez sexual	15
2.2.2 Comportamiento sexual	15
2.2.3 Fisiología reproductiva	16
2.2.4 Características del semen.....	17
2.2.5 Fisiología espermática	18
2.2.5.1 El espermatozoide.....	18
2.2.5.2 Estructura del espermatozoide	19
2.2.5.3 Membrana plasmática del espermatozoide	21

2.2.5.4 Espermatogénesis	22
2.2.5.5 Mitosis	23
2.2.5.6 Meiosis	23
2.2.5.7 Espermiogénesis	23
2.2.5.8 Maduración espermática en el epidídimo	24
2.2.5.9 Capacitación y reacción acrosomal	25
2.3 Evaluación seminal	27
2.4 Evaluación macroscópica.....	27
2.4.1 Consistencia y aspecto.....	27
2.4.2 Color.....	28
2.4.3 Volumen	28
2.4.4 Gel	28
2.5 Evaluación microscópica.....	28
2.5.1 Viabilidad	29
2.5.2 Movilidad	29
2.5.3 Morfología	30
2.5.4 Concentración	30
2.5.5 Integridad acrosomal	30
2.6 Conservación de gametos	31
2.7 Conservación espermática	33
2.7.1 Conservación de espermatozoides de conejo mediante refrigeración	33
2.7.2 Efectos sobre el espermatozoide causados por la refrigeración	35

2.8 Diluyentes	37
2.8.1 Características de los diluyentes	38
2.8.2 Componentes de los diluyentes	38
2.8.3 Suplementos	39
2.8.4 Yema de huevo	39
2.8.5 Leche descremada.....	40
2.9 Sincronización de celo	42
2.10 Inseminación artificial	43
2.11 Inducción a la ovulación	44
2.12 Fertilización	45
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	47
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS	48
4.1 General.....	48
4.2 Específicos.....	48
CAPITULO V. HIPÓTESIS	48
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS	49
6.1 Grupos experimentales e instalación	49
6.1.1 Machos	49
6.1.2 Hembras	49
6.2 Localización del estudio	49
6.3 Alimentación y nutrición	50
6.4 Primera etapa del experimento. Evaluación básica de calidad espermática y determinación de integridad del acrosoma	50

6.4.1 Diluyentes	50
6.4.2 Inspección sanitaria de los sementales	51
6.4.3 Extracción de los eyaculados	52
6.4.4 Evaluación básica de calidad seminal	52
6.4.5 Evaluación macroscópica	53
6.4.6 Evaluación microscópica	53
6.4.6.1 Movilidad masal	55
6.4.6.2 Movilidad progresiva	55
6.4.6.3 Viabilidad y morfología	56
6.4.6.4 Concentración	57
6.4.7 Procesamiento del eyaculado	57
6.4.8 Evaluación macroscópica y microscópica	58
6.4.9 Procesamiento del eyaculado	60
6.4.10 Determinación de la integridad acrosomal	60
6.5 Segunda etapa del experimento. Inseminación artificial	61
6.5.1 Diluyentes	61
6.5.2 Extracción de los eyaculados	61
6.5.3 Sincronización de celo en las hembras	61
6.5.4 Inspección sanitaria de las hembras	62
6.5.5 Inseminación artificial	62
6.5.6 Diagnóstico de gestación	63
6.5.7 Parto	63

6.6 Análisis estadístico	65
CAPÍTULO VII. RESULTADOS	66
7.1 Características de los eyaculados de los conejos Nueva Zelanda Blanco	66
7.2 Efecto de la refrigeración sobre los parámetros básicos de calidad espermática 66	
7.3 Efecto de la refrigeración sobre la integridad acrosomal	71
7.4 Efecto de la refrigeración seminal sobre los parámetros reproductivos en conejas inseminadas artificialmente	74
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN	77
CAPÍTULO IX. CONCLUSIÓN	96
CAPÍTULO X. REFERENCIAS	97
APÉNDICES	120
Apéndice 1: Formato de registro para evaluación macroscópica del eyaculado.....	120
Apéndice 2: Formato de registro para evaluación microscópica del eyaculado.....	120
Apéndice 3: Formato de control reproductivo (inseminación).....	121
Apéndice 4. Formato de control reproductivo (fertilidad y prolificidad)	121

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición centesimal de nutrientes de la yema de huevo	39
Cuadro 2. Componentes y cantidad de inclusión del diluyente TY	51
Cuadro 3. Componentes y cantidad de inclusión del diluyente TL.....	51
Cuadro 4. Criterios establecidos para la inclusión de los eyaculados.....	52
Cuadro 5. Criterios establecidos para la evaluación de la movilidad	55
Cuadro 6. Indicadores espermáticos en semen fresco de conejo evaluados <i>in vitro</i>	55
Cuadro 7. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación, sobre el estado de capacitación espermática en el conejo en diferentes diluyentes.....	72
Cuadro 8. Efecto del tipo de preservación de semen y diluyente sobre los parámetros reproductivos en conejas inseminadas artificialmente	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrones de tinción para la determinación de la viabilidad.....	56
Figura 2. Patrones de fluorescencia para la determinación de la integridad del acrosoma	69

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema1. Obtención, valoración y procesamiento del semen de conejo para su conservación en refrigeración y posterior evaluación post-refrigeración	54
Esquema 2. Obtención, procesamiento y evaluación del semen de conejo para la determinación de la integridad del acrosoma	59
Esquema 3. Evaluación post-refrigeración de semen de conejo para su utilización en la inseminación artificial.....	64

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación, sobre la movilidad progresiva del espermatozoide de conejo en diferentes diluyentes.....	67
Gráfica 2. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación, sobre la viabilidad del espermatozoide de conejo en diferentes diluyentes	69
Gráfica 3. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación, sobre la morfología del espermatozoide de conejo en diferentes diluyentes	70

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BSP	Proteínas del plasma seminal
CCO	Complejo cumulus-ovocito
CE	Capacitación espermática
CTC	Clortetraciclina
ECG	Gonadotrofina coriónica equina
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FIV	Fertilización in vivo
FSH	Hormona foliculoestimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPLs	Glicerofosfolípidos
Gpx	Glutación peroxidasa
HPC	Horas Post Coito
HL	Horas luz
HO	Horas obscuridad
IA	Inseminación artificial
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
KCl	Cloruro de potasio
LD	Leche descremada
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante

LHL	Lipoproteínas de alta densidad
NaCl	Cloruro de sodio
PB	Patrón B
PF	Patrón F
PRA	Patrón RA
PGF2 α	Prostaglandina GF2 α
PMSG	Gonadotropina sérica de yegua gestante
RA	Reacción acrosomal
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SLs	Esfingolipidos
SOD	Superóxido dismutasa
TL	Tris y leche
TRIS	Tris hidroximetil aminometano
TY	Tris y yema de huevo
UHT	Ultrapasteurización
UI	Unidades internacionales
YH	Yema de huevo
ZP	Zona pelúcida

RESUMEN

La inseminación artificial (IA) es una técnica que permite, en corto tiempo, la mejora de parámetros productivos y reproductivos que benefician a las unidades de producción cunícola. Durante el proceso de la técnica para semen refrigerado existe una disminución de células espermáticas. Sin embargo, comparado con otras técnicas la viabilidad espermática se encuentra dentro de los límites permisibles. Son pocos los estudios que se realizan para probar la eficiencia de diluyentes para incrementar la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides de conejo durante su almacenamiento a temperaturas cercanas a 0°C. En este estudio, se utilizaron un total de 4 sementales y 35 conejas nulíparas para evaluar la viabilidad espermática y capacidad fertilizante de los espermatozoides de conejo refrigerado y almacenado a 5°C con dos diluyentes a base de Tris (Tris-yema de huevo (TY) y (Tris-leche descremada (TL)). La movilidad progresiva (MP), viabilidad (V), morfología normal (MN) y estado acrosomal (EA) se compararon entre tratamientos mediante un ANOVA, utilizando el paquete estadístico NCSS. Un valor de P menor de 0.05 ($P < 0.05$) se consideró significativo. La MP, V, MN y EA fueron evaluados a las 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas post-refrigeración. Después de 24 de almacenamiento, la V y MN no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ambos diluyentes. Sin embargo, la MP presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) de hasta un 44.3% a las 24 horas, respecto a las 8 horas post-refrigeración y al control, con 70% y 87.5% respectivamente. El diluyente TY proporcionó la más alta protección y conservación de los parámetros MP, V y MN. Diagnóstico de gestación, fertilidad, y prolificidad mostraron un comportamiento independiente con respecto al tiempo en refrigeración y tipo de diluyente, excepto con el diluyente TY, que exhibió una disminución en el porcentaje de fertilidad conforme incrementa el tiempo en refrigeración. Estos resultados indican que los diluyentes TY y TL son eficaces para la conservación de la viabilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides de conejo refrigerados a 5° C.

ABSTRACT

Artificial insemination (AI) is a technique that allows, in short time, improving productive and reproductive parameters that benefit rabbit production units. During the refrigerated semen process exist a reduced sperm cells. However, compared with other techniques the sperm viability is within permissible limits. There exist few research conducted to test the efficiency of diluents to increase the viability and functionality of rabbit sperm during storage at temperatures near 0 ° C. In this study, a total of 4 stallions and 35 nulliparous rabbits were used to assess sperm viability and fertilizing capacity of sperm rabbit cooled and stored at 5 ° C with two based thinner Tris (Tris-egg yolk (TY) and (Tris-skim milk (TL). Progressive motility (PM), viability (V), normal morphology (NM) and acrosome stage (AS) were compared between treatments using ANOVA and the statistical package NCSS. A P value less than 0.05 ($P < 0.05$) was considered significant. The PM, V, NM and AS were evaluated at 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours post-cooling. After 24 of storage, NM and V showed no significant difference ($P > 0.05$) between the two diluents. However, the PM presented significant difference ($P < 0.05$) up 44.3% at 24 hours, about 8 post-cooling and control hours with 70% and 87.5% respectively. The TY diluent provided the highest protection and preservation of parameters PM, V and NM. Gestation diagnosis, fertility and prolificacy showed independent results over time in refrigeration and type of diluent, except with the TY diluent which exhibited a decrease in fertility rate increases as the cooling time. These results indicate that the TL and TY diluents are effective for preserving the viability and fertilising capacity of sperm rabbit cooled to 5 ° C.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de conejos, según datos del sistema estadístico de la FAO 2010, reporta que China ocupa el primer lugar a nivel mundial en producción de carne de conejo, seguido de España, Venezuela, Italia y Corea del Norte. La cunicultura en estos países ha experimentado un gran desarrollo, motivado por la mejora en las tecnologías aplicadas a la reproducción, donde la evaluación del semen, los métodos de conservación del mismo y la inseminación artificial (IA) han permitido una tendencia a la mejora en los resultados de fertilidad.

En México, la actividad cunícola ha tenido un desarrollo limitado (Torres, 2012). En 2001 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), reconoció de manera oficial a la cunicultura como actividad ganadera y el Sistema Nacional de Información inicio el registro estadístico de esta actividad productiva. En 2007, el inventario nacional de conejos fue de 500,349 cabezas, ocupando el décimo cuarto lugar mundial como productor, con una producción de 4,200 toneladas anuales. El Estado de México se ubicó en el primer lugar como productor con 151,054 cabezas, que representaron el 30.2% de la población nacional, considerando en su territorio a los tres municipios con mayor población cunícola a nivel nacional, Tecámac, Milpa Alta y Jocotitlán (Ortega, 2012).

Las unidades de producción desarrollan la cunicultura basados en tres sistemas diferentes: i) Sistema empresarial o comercial, representado por 5% de la población, ii) Sistema semi empresarial constituyendo el 15% de la población (Mendoza, 2001) y iii) Sistema familiar de traspatio o autoconsumo; con una cobertura prácticamente en todo el territorio nacional con 80% de la población (Torres, 2012). Todos basados en la elección de un ritmo reproductivo específico obedeciendo sobre todo al plan de producción, de las limitaciones en el trabajo diario y la previsión de resultados contando con la aptitud genética de los animales, el tipo de alojamiento, el manejo y el programa de alimentación y selección genética (Contera, 1988). Estos sistemas; aunque rústicos, tienen el gran potencial de ser bancos de germoplasma, que deberían ser considerados por los planes gubernamentales como diversidad genética.

La aplicación de tecnologías a nivel reproductivo en la actividad cunícola nacional, permitiría hacerla más eficiente y disminuir la actividad de traspatio dirigida al autoconsumo, orientándola hacia una actividad empresarial competitiva.

La investigación en la cunicultura ha sido escasa en el país y se ha generado de manera desarticulada y dispersa; además de no aprovechar los beneficios biológico-económicos que ofrece la especie, como son: tamaño pequeño, reducida necesidad de espacio, consumo de alimentos con un alto contenido de fibra, alta eficiencia y conversión alimenticia, elevada prolificidad, ciclo reproductivo corto y amplio grado de diversidad genética. Aspectos que deben ser considerados, puesto que la maximización productiva del conejo está supeditada al control y manipulación de cada uno de los eventos biológicos típicos de la especie (Castellini, 2008). Sin embargo, en latitudes donde existe una marcada duración de horas luz, existe una disminución de la fertilidad en las conejas, ocasionando una disminución en el número de vientres gestantes. Por tanto, la inseminación artificial (IA) ofrece ventajas de manejo, ya que permite sincronizar partos de un gran número de animales usando un número mínimo de sementales, disminuye el riesgo de diseminación de enfermedades y permite la utilización de semen refrigerado (Bilbao, 1996). La IA no es por sí misma una herramienta de mejoramiento genético, pero en virtud de que se obtiene una gran cantidad de descendientes de un mismo macho, la selección de ellos ha de ser muy exigente. Es así, como sólo unos pocos individuos, son progenitores de un alto porcentaje de los individuos de las siguientes generaciones con características deseables (Guevara, 2001).

Uno de los factores más importantes involucrados en la IA es el medio en el que se diluye el semen (Castellini, 1996), el cual permitirá mantener una mayor proporción de espermatozoides vivos hasta el momento de la inseminación (Vega *et al.*, 2012).

Potencialmente, la viabilidad del semen de conejo conservado, permite mayor flexibilidad de uso en programas de IA, ofreciendo la oportunidad de trasladar el semen a las unidades de producción para su utilización (Martínez *et al.*, 2006).

Hasta ahora, se han desarrollado muchos protocolos y extensores para la criopreservación de espermatozoides de conejo. Sin embargo, los efectos ocasionados por el proceso de congelación-descongelación, limitan su utilización a un nivel comercial, debido a la disminución de la fertilidad y prolificidad obtenidas con el uso de semen criopreservado, en comparación con el uso de semen fresco (Hernández *et al.*, 2004).

El uso de semen refrigerado a temperaturas intermedias (16 - 20 °C) o aún más bajas (5 ° C) domina en diferentes especies. Para la conservación de espermatozoides de conejo, la refrigeración es el método más adecuado. Sin embargo, requiere que el semen pueda ser mantenido en condiciones tales, que aseguren una alta fertilidad de por lo menos 24 horas, tiempo en el cual se podrían transportar las dosis a una distancia considerable (Hernández *et al.* 2004) manteniendo la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides alcanzando parámetros espermáticos aceptables, tales como: movilidad progresiva rectilínea e integridad de la membrana plasmática (Puente y Tartaglioni 2013).

A diferencia de otras especies, los espermatozoides de conejo presentan una baja permeabilidad al agua y un alto coeficiente de activación de energía; razones por las cuales la supervivencia espermática resulta inferior al utilizar técnicas como la criopreservación. Por tanto, la conservación de semen de conejo mediante refrigeración constituye una estrategia oportuna para alargar la viabilidad espermática reduciendo la alteración de la funcionalidad y pérdida de la viabilidad al ser sometidos al proceso congelación/descongelación. Así pues, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos diluyentes para la refrigeración (5°C) seminal hasta las 24 horas sobre la calidad espermática del conejo y los parámetros de fertilidad y prolificidad de las hembras inseminadas artificialmente con el semen refrigerado.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra comprende ovarios, oviducto, útero, cérvix, vagina y vulva. Las estructuras antes mencionadas, exceptuando las dos últimas, se presentan en par (Mc Nitt *et al*, 2000).

Los ovarios permanecen en la cavidad abdominal y sus funciones son exócrinas y endócrinas. Los ovarios de la coneja miden aproximadamente 1.5 cm de longitud y 0.5 cm de grosor. El ovario se encuentra rodeado por una capa densa de tejido conjuntivo, bajo el epitelio, denominada túnica albugínea; está dividido en las porciones cortical externa y medular interna. La corteza contiene estructuras foliculares en diferentes etapas de desarrollo: folículo primordial, folículo primario, folículo secundario, folículo terciario, folículo maduro, folículo o cuerpo hemorrágico, folículo atrésico, cuerpo lúteo, cuerpo lúteo en regresión y cuerpo blanco. La médula consiste en un estroma de tejido conjuntivo que contiene fibras elásticas, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y fibras de músculo liso (Caballero y Villa, 2010).

El oviducto es el órgano que permite la captación de los ovocitos liberados por el ovario y su posible fertilización. Es una estructura cilíndrica cuyo extremo libre se abre a la cavidad abdominal (Alvariño, 2000); su longitud, en la coneja es de entre 5 y 7 cm. Puede dividirse en cuatro segmentos funcionales: las fimbrias, en forma de olán; el infundíbulo, abertura abdominal en forma de embudo cerca del ovario; el ámpula, dilatada y más distal, y el istmo, la porción proximal estrecha del oviducto, que conecta a éste con la luz uterina (Hafez, 2002).

El útero es la estructura donde permanecen y de desarrollan los embriones hasta que se convierten en fetos y posteriormente nacen. Tiene una túnica serosa, muscular y mucosa gruesa, compuesta de tejido epitelial, glándulas y tejido conectivo (Caballero y Villa, 2010). La coneja presenta un tipo de útero denominado “doble”, ya que posee dos cuernos uterinos que

desembocan en forma independiente hacia la vagina; esto significa que también posee doble cérvix y consecuentemente carece de cuerpo uterino (Martínez, 1993).

La vagina como órgano copulador, está situada en la cavidad de la pelvis, entre el útero por la parte anterior y la vulva caudalmente. A la salida de la vagina y en ángulo inferior de ésta se encuentra el clítoris. La vulva es la porción externa de los genitales extendidos desde la vagina hasta el exterior (Alvariño, 2000)

2.1.2 Madurez sexual

En los animales domésticos, la presentación de la pubertad está más relacionada con el tamaño, el peso y la condición corporal que con la edad cronológica. Es un periodo que precede a la madurez sexual, ya que el individuo continúa su crecimiento y maduración, hasta expresar su máximo potencial reproductivo (Caballero y Villa, 2010). La pubertad en la hembra se manifiesta por la aparición del ciclo sexual, consecuencia del inicio de la actividad esteroidogénica y gametogénica por parte de las gónadas. La aparición de este proceso puede depender de factores tanto intrínsecos como extrínsecos, y de su interacción. Como factores extrínsecos se encuentra: las influencias que ejerce el medio ambiente, y con respecto a los intrínsecos: los factores genéticos y la interacción retina-glándula pineal-hipotálamo (Martínez, 1993).

El hecho de que una coneja empiece a ciclar no significa que tenga la madurez sexual suficiente como para procrear adecuadamente. Generalmente el apareamiento temprano va en detrimento del organismo de la hembra misma, pues deja de crecer, se puede presentar distocia, pierde peso en forma significativa durante la primera lactancia, etc. (Martínez, 1993).

Por ello se considera que la madurez sexual en conejas de talla mediana, como la Nueva Zelanda Blanco ha alcanzado el 80% del peso adulto (3.200 kg), el cual se presenta entre las 20 a 23 semanas de edad, en torno a este peso, se recomienda inseminar por primera vez a una coneja nulípara (Aragón *et al.*, 2010).

2.1.3 Comportamiento sexual

El periodo de receptividad o celo corresponde a la presencia de folículos pre-ovulatorios, los cuales liberan 17β -estradiol responsable del comportamiento sexual y de la típica coloración rojiza de la vulva en el momento del celo (Quiles y Hevia 1995). Durante la fase de proestro ocurre el crecimiento folicular, consecuentemente el aumento de los niveles de producción de estrógeno por los folículos, responsables por el comportamiento de celo y la receptividad, la cual es mayor a medida que la coneja se aproxima al estro (Capra y Blumet 2014). Se hace necesaria la presencia de las gonadotropinas hipofisarias como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) para la maduración folicular. Una vez alcanzado el estadio pre-ovulatorio del folículo, éste no es ovulado de manera espontánea y cíclicamente, sino hasta que exista el estímulo por parte del macho en el momento de la monta (Quiles y Hevia 1995).

El grado de receptividad de las conejas, caracterizado esencialmente por el color y la turgencia de los labios vulvares, determina en gran medida los resultados de fertilidad, la probabilidad de que una coneja con una coloración blanquecina (pálida) acepte la monta es prácticamente nula (menor de 10%), con un color rosado se situaría entre el 40% y el 60%, con un color rojizo entre el 80% y el 100% y con un color violáceo entre un 60% y un 80%. A su vez, la probabilidad de que las hembras montadas queden gestantes sigue una proporcionalidad semejante (Jiménez y Vicente, 2012).

Existen también factores medioambientales que facilitan los estados de rechazo o aceptación del macho. El factor luz representa una función protagonista, ya que fotoperiodos crecientes favorecen los periodos de aceptación, mientras que los fotoperiodos decrecientes los inhibe. La temperatura también influye en la actividad sexual de la coneja; donde el aumento de este factor provoca un descenso en la actividad sexual y su disminución induce de manera positiva esta conducta (Quiles y Hevia 1995).

La gestación de la coneja tiene una duración promedio de 31 días, aunque su rango oscila entre 30 y 35 días. Se ha comprobado la influencia de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos,

sobre la duración de la gestación. Por ejemplo: la duración de la gestación se incrementa cuando la cantidad de gazapos gestados es menor, cuando las conejas son primerizas y cuando la gestación se suscita en verano. Así mismo, durante el invierno, los partos tienen lugar en horarios diurnos y en verano se presentan en horarios vespertinos o nocturnos (Martínez, 1993).

Alrededor del día 26 de gestación, comienzan con la preparación del nido con diferentes materiales como sustrato, así como el pelo arrancado de su cuerpo, dos días antes del parto (Negatu y Mc Nitt 2002). Estas conductas para la construcción del nido las despliegan sólo las hembras gestantes. Su expresión está regulada por combinaciones hormonales de estradiol, progesterona, testosterona y prolactina (González, 2006).

2.1.4 Fisiología reproductiva

Las especies de ovulación inducida como los conejos, camélidos y gatos requieren la presentación de un pico de LH, la cual es producida como consecuencia del apareamiento. El nivel máximo de LH es alcanzado entre una hora y media y dos horas después del apareamiento. La ovulación se produce en ambos ovarios, a las 12 horas aproximadamente tras la descarga preovulatoria de la LH. Por lo tanto, en esta especie, este momento es fácilmente controlable mediante tratamientos hormonales con agentes análogos de la GnRH, en el caso de que se realicen procedimientos de IA (Álvarez, 2010).

Tras la ovulación, las células de la granulosa y de la teca del folículo luteinizadas, dan lugar al cuerpo lúteo productor de progesterona. Éste no se forma completamente hasta pasados 6 días en la coneja, y los niveles máximos de progesterona se alcanzan entre los 12-13 días, declinando progresivamente durante los últimos días de gestación. A su vez, la presencia de los embriones en el útero ejerce una acción antiluteolítica durante toda la gestación, ya que impiden la producción de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) por parte del endometrio, aunque se requiere un mínimo de dos embriones implantados para que la gestación pueda proseguir (Álvarez, 2010).

El periodo de gestación oscila entre 28 y hasta 36 días dependiendo la raza. Sin embargo, normalmente el parto se presenta en los 31 días después del apareamiento o inseminación artificial (Azeem, 2010).

La expulsión de las crías se efectúa dentro del nido. Conforme va emergiendo cada crío, la hembra lo limpia, consume la placenta y amamanta a toda la camada. Una vez concluidas estas actividades, la madre abandona el nido volviendo en 24 horas para nuevamente amamantar a los gazapos, y así, durante toda la lactancia (que dura aproximadamente 30 días). En contraste con la mayoría de las madres de los mamíferos que pasan gran parte del día interaccionando con sus críos, las conejas han reducido la actividad con la camada a un solo periodo de amamantamiento diario. Esta conducta se expresa con periodicidad circádica, es decir: cada 24 horas, aproximadamente, durante toda la lactancia, y con una duración de alrededor de tres minutos (González, 2006).

2.1.5 Fisiología ovárica

El ovario realiza dos funciones principales. Una es la producción cíclica de ovocitos fecundables. La segunda es la producción de una proporción balanceada de hormonas esteroides que mantienen el desarrollo del aparato reproductor, facilitan la migración del embrión y aseguran su implantación y desarrollo exitoso en el útero. El folículo es el compartimento ovárico que permite al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis. Los siguientes apartados explican el origen, estructura y madurez del ovocito hasta alcanzar su completa funcionalidad y tener la capacidad de ser fertilizado por el espermatozoide.

2.1.5.1 El ovocito

El ovocito deriva de las células germinales primordiales, que proliferan y migran a los ovarios potenciales durante el desarrollo fetal. Después de haber alcanzado los ovarios, las células germinales primordiales cesan su proliferación y entran en meiosis antes de ser detenidos en la

profase de la primera división meiótica. Por lo tanto, en especies mamíferas, todos los ovocitos que estarán disponibles a lo largo de la vida reproductiva ya están presentes en el ovario en el momento del nacimiento, contenidas dentro de los folículos primordiales; detenidos en la etapa de diploteno de la profase de la primera división meiótica y permanecerán así hasta el inicio de la pubertad (Dalton, 2012).

2.1.5.2 Ovogénesis

Durante el desarrollo fetal, las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación. Primero se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica (Martínez, 2002).

La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) cuyo objetivo es la reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética. Antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento 4 copias de ADN y un número $2n$ de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimida, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides (Martínez, 2002).

En la coneja, la ovogénesis se inicia al nacimiento y las ovogonias comienzan la meiosis y se transforman en ovocitos durante los primeros 10 días de vida. En la tercera semana de edad, el ovario ya presenta folículos primordiales y folículos en desarrollo, mientras que los primeros folículos antrales se detectan a partir de la 12ª semana de vida. De esta forma, en las primeras semanas después del nacimiento, la coneja ya contará con la dotación de ovocitos disponibles para el resto de su vida reproductiva. A partir de aquí, se producen oleadas de crecimiento folicular (foliculogénesis) y regresión (atresia) de manera constante, aunque el núcleo del ovocito permanecerá detenido en el estadio de diploteno de la profase de la primera división

meiótica, estadio nuclear que mantendrá hasta pocas horas antes de la ovulación (Álvarez, 2010).

2.1.5.3 Foliculogénesis

La unidad funcional del ovario es el folículo y se compone de un ovocito en desarrollo rodeado por una o varias capas de células somáticas que son el sitio de acción y síntesis de gran número de hormonas y factores de crecimiento que promueven y regulan el desarrollo folicular, gracias a un sistema de comunicación bidireccional mediante la transferencia de señales locales y endocrinas que se establece con las células somáticas y el ovocito (Skinner, 2005).

El desarrollo folicular en el ovario es iniciado por la proliferación de las células de la granulosa alrededor del ovocito y posteriormente por la diferenciación de las células intersticiales del estroma para formar la teca inicial. Tanto la granulosa como la teca proliferan durante la subsiguiente etapa de desarrollo y crecimiento folicular, y darán lugar a un grupo de folículos pre-antrales y posteriormente antrales, de los cuales se seleccionarán los folículos dominantes (Rosales y Guzmán 2008). Estas células intersticiales se asocian íntimamente con el ovocito a través de numerosos procesos de interdigitación durante toda la fase de crecimiento folicular junto con las uniones comunicantes, las cuales permiten la transferencia de nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de los ovocitos (Voronina y Wessel 2003).

El desarrollo de folículos a etapas antrales y su posterior selección y dominancia dependen de la sensibilidad de éstos respecto a las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH), delimitando su desarrollo a tres periodos: reclutamiento, selección y dominancia. Los mecanismos de expresión génica son variables a lo largo del tiempo, por lo que en células de la granulosa, la teca y el ovocito se incrementa la expresión específica de algunos genes y sus productos (Caballero y Villa, 2010).

Durante la foliculogénesis, la maquinaria molecular del ovocito está activa. El nucléolo presenta una estructura fibrogranular que refleja la actividad sintética del ovocito durante su crecimiento. En este periodo, sintetiza y almacena grandes cantidades de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas (a lo que debe su aumento de tamaño). Además, aumenta el número de mitocondrias, se sintetizan los gránulos corticales y se forma la estructura del citoesqueleto, a través de la cual se distribuyen los organelos. Debido a que, durante la maduración posterior no hay expresión génica en el ovocito, todo el material sintetizado y almacenado durante el crecimiento es el que se utilizará para el metabolismo posterior tanto del ovocito como del embrión (Álvarez, 2010).

2.1.5.4 Maduración del ovocito

La maduración del ovocito es la última de una serie de etapas que debe atravesar el gameto femenino para adquirir la capacidad de ser fecundada y dar origen a un nuevo individuo (Lattanzi, 2010). El ovocito adquiere una organización citoplásmica que depende de la expresión de genes y de la multiplicación, modificación y redistribución de organelos, además de la modificación postranscripcional de los mARNs que serán acumulados para su posterior uso durante el clivaje temprano del embrión (Trounson *et al.*, 2001). Estas modificaciones son reguladas paráacrinamente por una compleja comunicación bidireccional con las células somáticas que lo rodean. Esta regulación local es coordinada por factores endocrinos que son secretados en forma cíclica. Como resultado de la interacción entre los diferentes niveles de regulación, paráacrina y endocrina, solamente unos pocos ovocitos son seleccionados para iniciar la etapa de maduración a lo largo de la vida fértil, mientras que la mayor parte degeneran en atresia. Para dicha selección existen tres puntos de control importantes para la regulación del ciclo celular: i) ocurre durante la fase G1 donde se monitorea el crecimiento y tamaño celular, ii) se da en la fase S y vigila la replicación del ADN y el iii) se presenta en la fase G2, donde se reconocen posibles daños o anomalías sobre el huso meiótico. Al final de la etapa de maduración ocurre la ovulación, y el ovocito es, durante una corta ventana de tiempo, una célula completamente competente capaz de dar origen a un nuevo individuo si es fecundada en un determinado periodo de tiempo (Lattanzi, 2010).

2.1.5.5 Ovulación

La ovulación o ruptura del folículo y liberación del óvulo ocurren a medida que el folículo maduro y sus paredes se deterioran, presentando en ese momento y en las fases siguientes de desarrollo una elevada turgencia. Momentos antes de la ovulación, el folículo se reblandece debido a la distensión y necrosis de la pared. El folículo se abulta para formar una proyección en forma de cono en el cual se produce el rompimiento. El líquido folicular sale al exterior arrastrando consigo la masa celular del óvulo, la cual se desprende de las células de la granulosa que muestran signos de degeneración. La liberación de la masa celular permite al óvulo y las células que la rodean quedar libres en la porción infundibular del oviducto.

El conejo es una especie de ovulación inducida, donde actúan conjuntamente estímulos sensoriales y neuroendocrinos que promueven un pico de LH preovulatorio, determinando la respuesta ovulatoria (Laborda, 2011). La excitación sexual del acoplamiento o monta desencadena un estímulo nervioso, que partiendo de las zonas erógenas táctiles del aparato genital parte a lo largo de la médula espinal hasta llegar al bulbo raquídeo y al tálamo. Posteriormente este mensaje es dirigido al rinocéfalo. Este último, junto con la zona neocortical, inhibe el reflejo de huida de la coneja ante la monta del macho. Las informaciones del ambiente (olfativas, auditivas, visuales y gustativas) pueden estimular también otras zonas de la neocorteza, favoreciendo el proceso de ovulación. A partir de la neocorteza a través de vías nerviosas, la orden de ovulación llega al hipotálamo. El mensaje eléctrico nervioso es convertido en un mensaje hormonal denominado factor liberador de hormonas gonadotropicas (GnRH). Estos factores son captados por el sistema sanguíneo portal que comunica el hipotálamo con la adenohipófisis, la cual secreta hormonas FSH y LH, quienes actúan sinérgicamente sobre el ovario. Donde esencialmente, la FSH provoca el desarrollo y maduración de los folículos y la LH da lugar a la ruptura folicular y ovulación de los folículos de Graff.

Los niveles plasmáticos de LH comienzan a elevarse a menos de 3 minutos después del apareamiento y llegar a una meseta dentro de los 15 a 75 min (Rebollar *et al.*, 2011).

Aproximadamente 8 horas post-coito (h. p. c.), los folículos preovulatorios comienzan a liberar a los ovocitos y hacia las 14 h. p. c. puede considerarse a la ovulación completada (Laborda, 2011).

2.2 Anatomía del aparato reproductor del macho

El aparato reproductor del macho se compone de: testículos, conductos eferentes, epidídimo, conducto deferente, uretra, pene y glándulas accesorias (Alvariño, 2000).

Las envolturas del testículo son desprendimientos o continuaciones de las capas de la pared abdominal y pueden subdividirse en forma análoga a estas en: bolsa testicular o escroto, compuesta por piel externa, túnica dartos, fascia espermática externa y musculo cremáster; y proceso vaginal, compuesto de fascia espermática interna y lamina parietal (Konig y Liebich, 2008). En el conejo, los testículos presentan forma ovoidal alargada, con una longitud de 30 a 40 mm y 10 mm de ancho, estando situado en sacos escrotales, a ambos lados de la línea media inguinal (Alvarino, 2000).

Los testículos están constituidos por una túnica albugínea que es una capa fibrosa que se extiende al interior de la gónada, formando los tabiques testiculares, entre los que se encuentran los túbulos seminíferos que contienen a las espermatogonias y células de Sertoli, fuera de los túbulos se encuentran las células de Leydig (Pichardo y Reyes, 2005). La rete testis es una red de túbulos rectos que conecta a los túbulos seminíferos con los conductos eferentes, a través de los cuales los espermatozoides llegan al epidídimo. (Mc Donald, 1991)

El epidídimo es un tubo altamente convolucionado en la que se reconocen tres regiones anatómicas: a) la cabeza o caput, que recibe a los espermatozoides y fluido de los vasos o conductos eferentes testiculares; b) el cuerpo o corpus, más estrecho, que conecta con la última región y c) la cola o cauda, con una apariencia globosa que, se encarga de almacenar los espermatozoides hasta la eyaculación (Rodríguez, 2011).

El túbulo epididimario se compone de dos grandes compartimentos: el epitelio y el lumen. El epitelio se encuentra rodeado por una capa estromal, el cual se compone de seis tipos celulares: células principales, basales, claras, estrechas, halo y apicales; por su parte, el lumen se compone de espermatozoides y fluido epididimario, el cual presenta en forma continua cambios importantes, modificando el entorno al que están expuestos los espermatozoides a medida que atraviesan el epidídimo (Robaire y Viger 1995).

El conducto deferente es la continuación de la cola del epidídimo, posee una luz pequeña e irregular, y una pared gruesa. Desde el epidídimo asciende hacia el anillo inguinal, conjuntamente con vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, formando el cordón espermático, y pasa por la superficie dorsal de la vejiga para unirse a la uretra, después de dilatarse en su porción terminal, constituyendo la ámpula deferente (Alvaríño, 2000).

La uretra o canal urogenital es un conducto único que se extiende desde la unión con el ámpula hasta la porción terminal del pene y es el conducto excretor, tanto para la orina como para el semen. Está revestida por músculo esquelético que le permite efectuar las contracciones eyaculatorias. Presenta orificios en forma de rendijas y cada uno recibe dos conductos, uno del conducto deferente y otro de la vesícula seminal. Aquí se integran los espermatozoides junto con el líquido de las glándulas accesorias para producir el semen (Pichardo y Reyes, 2005).

El pene es un órgano capaz de modificar su posición y tamaño durante la erección para permitir su intromisión en el órgano copulador de la hembra. Se extiende desde la sínfisis isquiática hasta la región umbilical, en posición de atrás hacia adelante. Se encuentra rodeado por delgada piel desplazable, que en su extremo anterior forma un repliegue llamado prepucio, que dispone de glándulas sebáceas. En el conejo, el pene no posee glande, y está formado por un órgano cilíndrico de 40 a 50 mm de longitud. Durante el reposo sexual se sitúa en el prepucio, situado ventralmente respecto al ano, en cuya abertura se localizan dos pares de glándulas inguinales sudoríparas y sebáceas. (Alvaríño, 2000).

En el conejo se distinguen la vesícula seminal, glándula vesicular, próstata y glándula bulbouretral o de Cowper como glándulas accesorias (Mc Nitt *et al.*, 2000).

2.2.1 Madurez sexual

Si bien la madurez sexual, definida como el momento en que la producción cotidiana de espermatozoides ya no aumenta, se alcanza en la raza neozelandesa hacia los 129 días de edad (Alvariño, 2000).

2.2.2 Comportamiento sexual

En machos, la testosterona es una de las hormonas que modula el comportamiento sexual (Fuentes *et al.*, 2004). El comportamiento de la monta presenta dos componentes. El primero constituye la conducción sexual o lóbido y el segundo incluye la fase de cópula, que involucra los ajustes de postura, intromisión, eyaculación y comportamiento postcopulatorio. El apareamiento en el conejo es muy rápido y consiste en movimientos pélvicos rítmicos a una frecuencia de 13 por segundo durante alrededor de uno a dos segundos. Durante este tiempo, el macho estimula los flancos y el dorso de la hembra, en respuesta, ella adopta una postura de lordosis, permitiendo la intromisión peneana, seguida casi inmediatamente de la eyaculación. La duración total de la intromisión peneana es de tan solo 200 milisegundos. El acoplamiento finaliza cuando el macho levanta las patas traseras y al extenderse hacia adelante pierde el equilibrio y cae hacia atrás o al costado de la hembra.

Las pautas de este comportamiento pueden observarse a partir de los tres meses de edad, siendo probable obtener las primeras eyaculaciones en torno a los cuatro meses. A partir de esta edad, la proporción de machos que manifiestan comportamiento de monta y eyaculación dependerá de condiciones ambientales y de la estirpe genética (Capra y Blumetto 2014)

2.2.3 Fisiología reproductiva

En general, la mejor edad para la primera cubrición fértil en estirpes o líneas de formato medio (3.5 a 4.5 kg) se sitúa entre los 5 y 5.5 meses, alcanzando la plena producción espermática entre los 7 y 8 meses de edad y, logrando mantener su actividad sexual hasta los 4 años, según la estirpe genética, condiciones ambientales y manejo (Jiménez y Vicente, 2012). No obstante, sobre el ardor sexual influyen numerosos factores, entre los que destacan la edad, hembra presentada y condiciones del medio ambiente (Alvariño, 2000). En general, el conejo manifiesta un elevado ardor sexual que, a diferencia de otras especies, no se corresponde con sus posibilidades de fecundar una hembra. La mayor parte de los machos de conejo de estirpes de formato medio son capaces de realizar entre 10 y 12 montas en un breve lapso de tiempo (30 a 60 minutos). Al respecto, la cubrición de una coneja más de una vez puede mejorar ligeramente las posibilidades de desencadenar la ovulación. Sin embargo, si se establece como práctica cubrir una coneja más de dos veces con el mismo macho, debe tenerse presente que el macho no produce una gran cantidad de espermatozoides y que no dispone de grandes reservas seminales, por lo que un intento, claramente innecesario, de asegurar la inducción de la ovulación puede desencadenar la falta de fertilidad de ese macho en una cubrición posterior sobre otra hembra. Estos problemas se acentúan durante el verano y el otoño, en primer lugar, por una pérdida de ardor sexual debido a las altas temperaturas y, en segundo lugar, por una disminución de la producción espermática (Jiménez y Vicente, 2012).

La mayoría de los machos tratan de practicar un apareamiento algunos segundos después de que se introduzca una hembra en su jaula. Cuando la hembra está en estro corteja al macho y presenta pautas de comportamiento sexual como: montas, mordidas, presentación del tren posterior levantando la grupa y agitando ligeramente la cola y se queda quieta ante la aproximación del macho; cuando éste la alcanza, la monta sujetándose a través de sus miembros anteriores sujetando los flancos de la hembra; generalmente también la muerde de la piel del dorso y ejecuta de 7 a 14 movimientos copulatorios rápidos; una vez lograda la penetración, eyacula en la zona superior de la vagina e inmediatamente después cae hacia atrás o hacia un lado, algunas

veces, emitiendo un chillido. Cuando la caída es lateral, generalmente el macho permanece prendido a la hembra por un lapso de 2 a 3 segundos (Martínez, 1993).

Al igual que en otros mamíferos, la fertilización se producirá en el ámpula unas 14 horas después de la monta o IA (Jiménez y Vicente, 2012).

2.2.4 Características del semen

El semen es una mezcla de espermatozoides producidos por los testículos y el plasma seminal secretado por las glándulas accesorias y por el epidídimo, que se combinan en el momento de la eyaculación (Castellini, 2008).

En el conejo, es un líquido traslúcido, blanquecino, rico en fructosa (0.4-4 mg/ml), ácido cítrico (0.5-6 mg/ml), que contiene sustancias orgánicas como inositol, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas (Alvarino, 2000) e inorgánicas (sodio, potasio y cloro) que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides. Los componentes orgánicos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la presión osmótica del semen, más que los iones inorgánicos. Los componentes orgánicos también son esenciales para mantener el metabolismo espermático y el pH, que en conejos oscila entre 6.8 -7.5 (Tabarez, 2014). Algunos de sus componentes son cruciales para el metabolismo, función, supervivencia y transporte del espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra (Castellini *et al.*, 2013).

La evidencia científica ha demostrado que una fracción de las partículas del plasma seminal, juega un importante papel en la fisiología de la reproducción de varias especies de mamíferos. En el conejo, contiene diferentes tipos de gránulos secretados por la parte anterior de la próstata llamada pro-próstata que representan alrededor del 15 al 20% del volumen de semen. Ellos se caracterizan por una composición única de lípidos, principalmente de fosfolípidos, colesterol y desmosterol; este último protege los espermatozoides contra el choque del medio ambiente y reacción acrosomal (RA) prematura. Además, estos gránulos contienen vitamina E; la cual brinda protección antioxidante relevante contra los radicales que son esenciales para la

inducción de la capacitación de los espermatozoides (Collodel *et al.*, 2012). Se han identificado diferentes tamaños de gránulos en el semen de varios mamíferos. En conejos, abundan en gran medida ($450 \times 10^6 / \text{ml}$), rodeados por una membrana bilaminar que contiene un material denso apenas organizada (Castellini, 2008).

Se ha propuesto la importancia de estos gránulos en la sincronización de la presencia de espermatozoides con la disponibilidad de ovocitos, elemento importante para las especies en las que la ovulación es inducida por el apareamiento. Donde la ovulación ocurre aproximadamente 10 a 16 horas después del apareamiento y durante esta fase de retraso los espermatozoides de conejo deben evitar la capacitación prematura y RA, por lo que se presume que dichas partículas seminales contribuyen en retrasar este proceso (Castellini, 2008).

2.2.5 Fisiología espermática

El espermatozoide debe atravesar por varias etapas fisiológicas para poder llevar a cabo la interacción con el ovocito, las cuales ocurren tanto dentro del tracto genital masculino como fuera de éste, una vez que fueron depositados en el tracto genital femenino. Las diferentes fases fisiológicas comprenden la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal. Dichos procesos fisiológicos son explicados en los apartados subsecuentes, y que para entenderlos, es necesario conocer qué es y cómo está integrada estructuralmente la célula espermática.

2.2.5.1 El espermatozoide

Los espermatozoides son los más divergentes de todos los tipos celulares, posiblemente debido a que la misión para la cual se encuentran diseñados debe cumplirse fuera del cuerpo y en el que son expuestos a varias barreras ambientales físicas y químicas (Inaba, 2011). Es una célula altamente diferenciada y especializada, cuya función en la propagación de la carga genética es establecida a través de la penetración y consecuente fecundación del ovocito (Armas, 2009).

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Estos túbulos contienen una serie compleja de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos (Hafez, 2002).

2.2.5.2 Estructura del espermatozoide

A pesar de que hay características específicas entre especies, los espermatozoides de los mamíferos comparten la misma estructura básica: i) una cabeza, cuya función principal es entregar un conjunto haploide de cromosomas al ovocito y ii) un flagelo que proporciona la movilidad a la célula para permitir desplazarse dentro del aparato reproductor de la hembra y penetrar la zona pelúcida del ovocito (Mortimer, 1997).

La cabeza, como característica principal, posee un núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas y va a contener un número cromosómico haploide, esto es, que va a poseer la mitad de cromosomas que existe en el núcleo de las células somáticas de la misma especie (Armas, 2009). La función principal de la cabeza, es precisamente, entregar de manera íntegra ese conjunto haploide de cromosomas al ovocito (Mortimer, 1997).

Progresando desde adentro hacia fuera, la cabeza del espermatozoide se compone de un núcleo, en el que el ADN se encuentra hipercondensado por acción de las protaminas, las cuales fueron sustituidas por otro tipo de proteínas, las histonas, durante la espermiógenesis. Esta hipercondensación brinda cualidades hidrodinámicas que favorecen la movilidad espermática y su penetración a través de las cubiertas del ovocito. El núcleo está cubierto por una reducida envoltura nuclear, seguida de la teca perinuclear, o también denominada matriz perinuclear, que concede protección. La teca perinuclear se divide en tres segmentos que reflejan y cumplen funciones únicas durante la fertilización: i) la región subacrosomal, ii) el segmento ecuatorial y iii) el segmento postacrosomal (De Jonge y Barratt, 2006).

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación. La reactividad de esta estructura representa un requisito absoluto para la fertilización y sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal (RA) de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este para formar un embrión (Cabrera y Pantoja 2012).

El flagelo proporciona la fuerza móvil necesaria para que el espermatozoide alcance la superficie del ovocito y logre la fertilización. Los diferentes elementos del flagelo generan y dan forma a las ondas de flexión que producen esta fuerza desde la base hasta la punta de la estructura móvil (Knobil y Neill 2006); se compone de una pieza intermedia, una pieza principal y una pieza terminal (Mortimer, 1997).

El axonema es una estructura que se encuentra en todas las regiones del flagelo, y es el aparato motor del espermatozoide. Está compuesto por un par central de microtúbulos y nueve pares periféricos que se encuentran formando un anillo. Los nueve pares de microtúbulos están rodeados por nueve fibras densas externas, estas estructuras se componen de varias proteínas ricas en zinc y puentes disulfuro que le dan la flexibilidad y la forma al movimiento flagelar (Almelaar *et al.*, 1980). Cada par de microtúbulos están unidos entre sí por una proteína llamada nexina que forma puentes entre los pares y permite la conexión entre ellos; a su vez existe en cada microtúbulo una proteína que se proyecta hacia adelante llamada dineína, la cual es la encargada de convertir la energía química que se encuentra en forma de ATP, a energía mecánica para que se realice el desplazamiento de los microtúbulos. La correcta secuencia de deslizamiento de los pares de microtúbulos, provoca que se formen y se propaguen las ondas, y así el flagelo experimenta su movimiento rotacional y elíptico característico (De Jonge y Barratt, 2006).

En el conejo, la longitud total del espermatozoide es de $55.29 \pm 3.35 \mu\text{m}$. La cabeza es visiblemente elipsoidal y con una longitud de $8.26 \pm 0.27 \mu\text{m}$ y $4.82 \pm 0.21 \mu\text{m}$ de ancho. Por otra parte, la longitud del acrosoma es de $3.91 \pm 0.13 \mu\text{m}$, la pieza media de $9.22 \pm 0.34 \mu\text{m}$ y el flagelo presenta una longitud de $47.00 \pm 3.30 \mu\text{m}$ (Ambriz *et al.*, 2003).

2.2.5.3 Membrana plasmática del espermatozoide

La organización de las células eucariotas está determinada en gran medida por sus membranas biológicas, cuya función y estructura se basan en las propiedades intrínsecas de los lípidos de membrana. Se consideran entidades dinámicas y fluidas ya que la mayoría de sus lípidos y proteínas son capaces de moverse en el plano de la membrana, además de sufrir un continuo recambio de sus componentes. Su estructura general es una bicapa lipídica, la cual es una estructura estable, que permite cierto grado de movilidad lateral de sus componentes permitiendo la creación de dominios altamente diferenciados en composición y arquitectura (Corona, 2014).

La membrana forma una barrera selectiva que separa, comunica y define a las células y sus organelos internos; además recibe y propaga señales importantes que controlan el comportamiento celular. Se sabe que la mayor parte de la actividad de una célula ocurre dentro o alrededor de las membranas, y en este contexto, su función no depende exclusivamente de las proteínas particulares que contienen, sino más bien, de la composición de los lípidos y estructuras lípido-proteína. Estas características participan en las funciones específicas de la célula, así como el control general de su fisiología (Escribá y Nicolson 2014). Su composición está dispuesta por diversos arreglos de lípidos que adoptan como arquitectura central la bicapa; los lípidos que componen la membrana son: i) los glicerofosfolípidos (GPLs), la familia más grande de lípidos membranales, en los cuales, las regiones hidrofóbicas están compuestas por dos cadenas de ácidos grasos unidos al glicerol; ii) los esfingolípidos (SLs), que componen la segunda familia más grande de lípidos membranales y al igual que los fosfolípidos tienen una cabeza polar (glucosa, fosfocolina, etc) y dos colas no polares, pero a diferencia de estos, no contienen glicerol sino una molécula del amino alcohol de cadena larga, denominada, esfingosina o uno de sus derivados, una de sus colas es una molécula de ácido graso de cadena larga y saturada y la otra es una cadena hidrocarbonada que forma parte de la esfingosina y está unida a ella mediante un enlace glucosídico o fosfodiéster y iii) los esteroides que son compuestos caracterizados por un sistema rígido de cuatro anillos de hidrocarburos fusionados y su principal representante es el colesterol (Bonales, 2004).

La compartimentalización de las membranas tanto estructural como funcional no solo depende de la propia composición lipídica sino también de su contenido de proteínas capaces de organizar los lípidos. La diversidad en las estructuras y propiedades físicas de los lípidos ofrece una amplia variedad de posibles interacciones con proteínas que afectan su ensamblaje, organización y función, ya sea en la superficie de o dentro de las membranas (Dowhan *et al.*, 2004). La combinación de estas dos macromoléculas dentro de las membranas hace posible la existencia de regiones con características fisicoquímicas y composición diferentes. De esta forma se originan microdominios de membrana en los que se concentran o segregan, según su afinidad, determinados tipos de lípidos y proteínas. Estos microdominios pueden desempeñar distintas funciones celulares como por ejemplo el tráfico intracelular de membranas en las rutas exocíticas y endocíticas o la formación de uniones celulares (Aranda, 2008).

2.2.5.4 Espermatogénesis

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis que consta de varias fases de divisiones sucesivas mitóticas, meióticas y posmeióticas. De estos eventos resulta una célula haploide altamente diferenciada en estructura y función, y capaz de combinarse con el ovocito y comenzar el desarrollo de un nuevo individuo. Esta célula, denominada célula germinal, es producida a partir de células madre (espermatogonias) diploides dentro de los límites de los túbulos seminíferos de los testículos. La espermatogénesis ha sido morfológicamente simplificado al reconocer asociaciones celulares o "etapas" y "fases" que avanza a través de ciclos espermatogénicos precisamente cronometrados y altamente organizados, esenciales para la producción continua de espermatozoides, la cual depende de numerosos factores, tanto intrínsecos (células de Sertoli y células germinales) como extrínsecos (andrógenos), así como la especificidad en la especie. El proceso de diferenciación celular consta de tres fases: mitosis, meiosis y espermiogénesis. Cada una de estas fases se describe a continuación.

2.2.5.5 Mitosis

Implica la proliferación y mantenimiento de espermatogonias. La cual precisa de estricto orden en la secuencia de eventos en donde el material genético (cromosomas) se duplica, acompañado por la disgregación de la envoltura nuclear y la formación de dos células hijas; resultado de la división equitativa de los cromosomas y el citoplasma. En esta fase de división celular pueden diferenciarse tipos celulares como las espermatogonias tipo A y B, así como espermatocitos primarios.

2.2.5.6 Meiosis

Caracterizada por dos divisiones sucesivas de material hereditario seguido por un único periodo de síntesis de ADN. La meiosis se inicia en los espermatocitos primarios, dando lugar cada uno de ellos a dos espermatocitos secundarios. Posteriormente se produce la segunda división meiótica dando lugar a las espermátidas. Al final, cada célula contará con un cromosoma del par homólogo recombinado y las cromátidas estarán unidas únicamente al nivel del centrómero. De esta forma por cada espermatogonia que entra en meiosis se obtienen cuatro células haploides (con una única copia de ADN) y genéticamente diferentes, dos de las portadoras del cromosoma X y las otras dos del Y, llamadas espermátidas.

2.2.5.7 Espermiogénesis

La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración de las espermátidas en espermatozoides, sin que se produzca división celular alguna. Entre los cambios de mayor relevancia, podemos destacar: la formación del acrosoma, el desarrollo del flagelo, la transformación del núcleo, la reorganización de los orgánulos y del citoplasma y la liberación de los espermatozoides desde el epitelio tubular al lumen (espermiación). Las diversas etapas de la transformación de las espermátidas se dividen en cuatro fases: de Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y de maduración (Hafez, 2000). El resultado final de todos estos procesos es la aparición de una célula (espermatozoide) altamente diferenciada y una serie de

restos del citoplasma conocidos como cuerpos residuales que serán absorbidos por las células de Sertoli vecinas (Tejerina, 2007).

En el conejo adulto la duración de la espermatogénesis, tiempo necesario para que se forme un espermatozoide a partir de una espermatogonia, es de 38 a 41 días. Una espermatogonia da 16 espermatoцитos primarios, de cada uno de los cuales se obtienen una media de 3,1 espermátidas. La producción diaria de espermatozoides se estima en 30 a 40 millones por gramo de testículo y día, siendo un total de 250 millones, con variaciones raciales y estacionales (Alvariño, 2000).

2.2.5.8 Maduración espermática en el epidídimo

La capacidad fertilizante de los espermatozoides testiculares es adquirida solo después del tránsito por el epidídimo; donde al final de esta estructura, el gameto masculino es capaz de moverse, experimentar el proceso de capacitación, migración a través del tracto reproductor de la hembra, unión con la membrana del ovocito y fusión entre gametos para la obtención de un embrión viable (Dacheux y Dacheux 2013). Se ha encontrado, en el cuerpo distal del epidídimo de conejo, poblaciones de espermatozoides capaces de penetrar en un gran porcentaje los ovocitos correspondientes. Una vez que tal capacidad es adquirida, no se producen aumentos significativos de la misma en regiones más distales del epidídimo (Regalado., 1992).

Los cambios que ocurren en los espermatozoides son inducidos por la presencia de sustancias secretadas y por la eliminación de otras que son absorbidas por parte de tipos celulares particulares presentes en el epitelio epididimario (principales, basales, apicales, estrechas y halo). Estos tipos celulares, los cuales son dependientes de estimulación androgénica, secretan las proteínas que interactúan con el espermatozoide como parte de la maduración para convertirse en gametos completamente funcionales (Knobil y Neill, 2006). Los cambios estructurales y funcionales de los espermatozoides como la condensación nuclear, pérdida de la gota citoplasmática, cambio en la carga superficial y cambios en la morfología del acrosoma, se deben a la utilización de fosfolípidos y colesterol como sustratos durante la maduración en el

epidídimo. (Barrios, 2002). La maduración espermática en el conejo se realiza entre los 8 a 10 días (Avariño, 2000).

2.2.5.9 Capacitación y reacción acrosomal

Los espermatozoides recién eyaculados son móviles y viables, no obstante son incapaces de fecundar al ovocito (Risopatrón *et al.*, 2005). Para lograr esta función, es necesario que experimenten algunos cambios estructurales y bioquímicos durante el recorrido por el tracto genital de la hembra, que los habilitan para fertilizar al óvulo. Este proceso se le conoce como capacitación espermática (CE), indispensable para que ocurra la fertilización. En la coneja se ha comprobado que la fecundación *in vitro* requiere una previa capacitación, que puede conseguirse por incubación del espermatozoide en las vías genitales de la hembra durante, al menos, seis horas (Alvariño, 1995). La capacitación espermática y los procesos relacionados son el resultado de varios eventos bioquímicos intracelulares (Ferramosca y Zara 2014) tales como la modificación del pH intracelular, incremento de la permeabilidad para iones como el Ca^{2+} , aumento en la fluidez de la membrana plasmática y su metabolismo, y la modificación de los patrones de fosforilación de proteínas y composición lipídica. Además de llevar a cabo la hiperactivación espermática, caracterizada por un incremento en la amplitud de curvatura flagelar, presentado por un batido asimétrico, el cual ayuda al espermatozoide a nadar a través del moco del oviducto y penetrar en la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Risopatrón *et al.*, 2005), al igual que por la acción de la proteína PH-20 localizada en la membrana plasmática del espermatozoide que posee un dominio con actividad hialuronidasa (Primakoff y Myles, 2002).

La ZP es una capa extracelular transparente compuesta por una matriz de glicoproteínas que rodea los ovocitos. Tiene un papel fundamental en la fertilización incluyendo la unión especie-específica del espermatozoide-ovocito, la inducción de la reacción acrosómica, el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión (Epifano y Dean, 1994).

El espermatozoide que alcanza y se une a la ZP, recibe una señal y se producen cambios moleculares complejos que dan lugar a la aparición de zonas de perforación en el acrosoma,

generándose múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana externa del acrosoma. La fragmentación de las membranas en estos puntos hace que aparezcan zonas de comunicación o abertura (Moore *et al.*, 2013). Los cambios inducidos por la reacción acrosomal se asocian a la liberación de enzimas por parte del acrosoma, como la hialuronidasa y la acrosina, encargadas de disolver las envolturas ovocitarias facilitando el proceso de fertilización (Tabarez, 2014).

Por tanto, el reconocimiento de la ZP por el espermatozoide puede ser dividido en dos fases: i) unión primaria en la cual el acrosoma intacto del espermatozoide se une con proteínas de la ZP; y ii) unión secundaria en la cual el espermatozoide reaccionado expone una serie de proteínas intra acrosomales con alta afinidad a la ZP (Avilés, 2011).

Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP y ha sufrido la RA, el siguiente evento es contactar con el ovocito. Tras la RA se provoca una remodelación de la superficie del espermatozoide, quedando expuesta la membrana acrosomal interna, que contactará con las microvellosidades del ovocito. La interacción se inicia con una primera unión lábil y a continuación tiene lugar la adhesión celular propiamente dicha entre los dos gametos, para culminar con la fusión de las dos membranas (Cánovas y Coy 2008).

Durante la fusión de gametos del ovocito maduro los gránulos corticales se fusionan con el oolema y liberan su contenido dentro del espacio perivitelino en un evento de exocitosis llamado reacción cortical, regulada por procesos moleculares que incluyen al Ca^{2+} , el inositol 1, 4, 5 trifosfato que induce la liberación del Ca^{2+} almacenado en los compartimentos celulares, la proteína G y proteínas calcio dependientes. Durante este proceso, los gránulos corticales liberan enzimas que participan en la eliminación de los receptores para los espermatozoides que están localizados en la glicoproteína ZP3, previniendo la unión e inicio de la reacción acrosómica en la superficie externa de la ZP de más espermatozoides, regulando así la polispermia (Saavedra, 2009). En cuanto se produce la fusión del espermatozoide y el ovocito, éste se activa, proceso que conlleva a la reanudación de la meiosis. (Barajas, 2013).

2.3 EVALUACIÓN SEMINAL

La célula espermática es el componente más importante del semen, ya que está diseñado para pasar a través del tracto reproductor de la hembra, someterse a la capacitación, unirse a la zona pelúcida, penetrar el ovocito, y ofrecer un conjunto haploide normal de cromosomas a este último. Los espermatozoides se obtienen fácilmente en grandes cantidades para estudiar varios rasgos que son indicadores directos de la fertilidad. Por lo que su valoración por medio de análisis espermatozoscópico sigue siendo una de las herramientas de evaluación más empleadas en la selección de reproductores (Foote, 2003).

La valoración macro y microscópica del material seminal permite determinar la calidad, viabilidad y fertilidad de los espermatozoide. No se dispone de una prueba única para determinar con exactitud la fertilidad de los eyaculados individuales, pero cuando se combinan cuidadosamente varias de ellas, se pueden seleccionar los eyaculados para utilizar los que tengan un potencial de fertilización más elevado que los que son desechados (Aisen, 2004)

2.4 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

El análisis macroscópico del eyaculado consiste en una valoración general y rápida de aquellas características del mismo que se pueden evaluar a simple vista y que proporcionan información especialmente valiosa ante problemas muy evidentes de calidad (Buxadé y Sánchez, 2000). La valoración de parámetros macroscópicos en conejos implica: consistencia y aspecto, color, volumen y presencia de gel (Barajas, 2013).

2.4.1. Consistencia y aspecto

El semen de conejo es un líquido denso-cremoso. A medida que aumenta el número de eyaculaciones en una misma jornada, el semen se torna más claro por disminución de la concentración espermática (Alvariño, 2000).

2.4.2 Color

Es la primera observación que se realiza en el eyaculado. En conejos, se valoran como aptos, aquellos eyaculados que presentan color blanco – nacarado, desestimándose los que presentan coloraciones amarillentas (presencia de orina) o rojizas parduzcas (presencia de sangre por lesiones en estructuras reproductivas internas) (Lavara *et al.*, 2003).

2.4.3 Volumen

En conejos, el volumen de semen varía entre 0,3 y 6,0 ml dependiendo de la secreción de las glándulas accesorias incluyendo la fracción gel (Fallas, 2010).

2.4.4 Gel

El semen de conejo es un líquido denso y cremoso a medida que suceden los saltos o extracciones en una misma jornada, el líquido espermático se hace más claro por disminución de la concentración espermática. En condiciones de monta natural se coagula en la vagina, impidiendo que los espermatozoides refluyan hacia el exterior del tracto genital de la hembra (Alvariño, 2000). El porcentaje de eyaculados que presentan gel (o tapón mucoso) varía dependiendo de la estación del año siendo más habitual su presencia en los eyaculados recuperados en primavera. En IA es necesario proceder a la extracción inmediata si se presenta, ya que se este elemento propicia la aglutinación de los espermatozoides; dificultando la evaluación del eyaculado (Lavara *et al.*, 2003).

2.5 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

El espermiograma clásico incluye un conjunto de pruebas microscópicas desarrolladas para estimar la calidad seminal *in vitro* y poder correlacionarla con la fertilidad *in vivo* (Saffa *et al.*, 2008; Buxadé y Sánchez, 2000). Los parámetros microscópicos son: viabilidad, movilidad,

morfología, concentración y estado de la integridad del acrosoma de los espermatozoides, en razón a que existe relación de estos parámetros con la fertilidad real del animal (Barajas, 2013).

2.5.1 Viabilidad

La viabilidad de los espermatozoides es un factor determinante de la calidad del espermatozoide y el requisito previo para fertilización exitosa (Di Lorio, 2014), ya que una membrana plasmática intacta es necesaria para mantener las actividades metabólicas intracelulares e interactuar con la zona pelúcida de un ovocito (Almela, 2014).

El termino viabilidad o vitalidad espermática es generalmente utilizado para referirse a los espermatozoides con membrana plasmática intacta (Almela, 2014). La integridad de la membrana plasmática se muestra por la capacidad de una célula viable para excluir el colorante, mientras que el tinte se difunde pasivamente en las células con daño en su membrana plasmática (Di Lorio, 2014).

2.5.2 Movilidad

Movilidad es una de las características más importantes asociados con la capacidad fecundante de una muestra seminal. Es un atributo importante, porque es fácilmente identificable y refleja la estructura, funcionalidad y competencia espermática, así como aspectos esenciales de su metabolismo. Este parámetro también es definido como la capacidad de movimiento de la célula espermática (López-Brea, 1992).

Existen varias técnicas de estudio de la movilidad, pero la más utilizada y a la vez más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. La movilidad espermática es un elemento indispensable para que ocurra la fecundación natural (Montenegro y Chimarro, 2013).

2.5.3 Morfología

La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripán/Giemsa o el amarillo de naftol/eritrosina. De hecho, posiblemente la tinción más utilizada es la eosina-nigrosina, la cual es económica, accesible y fácil de realizar. Esta tinción tiñe de color rosado los espermatozoides que presentan una membrana alterada, mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco sobre un fondo purpura (Quintero, 2003).

2.5.4 Concentración

Existe gran variabilidad en la concentración espermática de un eyaculado a otro (Barajas, 2013), por lo que es importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de éste parámetro depende el número de dosis seminales que se obtendrán. En conejos, la concentración espermática puede situarse entre 50 y 500 millones de espermatozoides por ml (Alvariño, 2000). Existen diferentes métodos para determinar la concentración espermática en el semen. Una forma puede ser la utilización de hemocitómetros (Neubauer, Thomas-Zeib y Burker-Turk). Estas se basan en realizar una dilución (1:100; 1:200), de la muestra de semen con solución salina, para finalmente observarse con un microscopio óptico (40x) (Almela, 2014).

2.5.5 Integridad del acrosoma

En un espermatozoide que tenga el acrosoma intacto, se pueden distinguir tres regiones en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Los daños en el acrosoma provocan que se liberen enzimas, dentro de las más importantes, acrosina y hialuronidasa que alberga en su interior, impidiendo la fertilización, de forma que si el porcentaje de estas alteraciones es elevado, puede provocar un descenso de la fertilidad (Ferrian, 2007), por lo que conviene realizar una valoración específica del mismo (Tabarez, 2014).

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se puede recurrir a la utilización de tinciones fluorescentes como la clortetraciclina (CTC), la cual se une a los iones de calcio asociados a las proteínas de la cara interna de la membrana de la cabeza de los espermatozoides, permitiendo así la visualización de la localización de los iones de calcio y su cambio, asociados al proceso de capacitación (Ferrian, 2007). La utilización de CTC tiene el potencial de producir patrones de fluorescencia que reflejan el estado del acrosoma, así como la dinámica del proceso de capacitación en el espermatozoide. Siendo de la siguiente manera: patrón F, con fluorescencia ligera uniformemente distribuida en toda la cabeza del espermatozoide, representado por los espermatozoides incapacitados con acrosoma intacto; patrón B, con fluorescencia en la región acrosomal, representado por los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto; y patrón RA, con ausencia o presencia de una fluorescencia pequeña en la cabeza, y presencia de una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial del espermatozoide, representado por los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal (Avila, 2006).

2.6 CONSERVACIÓN DE GAMETOS

Desde el desarrollo inicial de la IA a mediados de la década de 1940 hasta las posibilidades más recientes que ofrece el almacenamiento y transferencia de ADN, las biotecnologías reproductivas han sido fundamentales para la transferencia de material genético *in vivo* e *in vitro*. Las técnicas actualmente accesibles y económicamente viables para la conservación *in vitro* de recursos zoogenéticos incluyen la crioconservación de células reproductivas, embriones y tejidos. Los materiales conservados mediante estas técnicas siguen siendo viables y funcionales durante decenios o incluso siglos (FAO, 2010).

La criopreservación de ovocitos es una valiosa herramienta para preservar la biodiversidad genética de los animales, pero no se utiliza a menudo debido a la reducida fertilidad se recuperación después de la descongelación. Actualmente, la preservación de la diversidad genética en la especie cunícola sólo se realiza por congelación de embriones en la fase de mórula compacta. La criopreservación de ovocitos no se utiliza debido a la muy reducida fertilidad de

recuperación tras la congelación lenta, la congelación rápida o la vitrificación (Salveti *et al.*, 2010).

El conejo se ha utilizado como modelo animal para estudiar la reproducción de los mamíferos durante más de un siglo. Para tal fin, diferentes tecnologías para el desarrollo de embriones de conejo de manera *in vitro* han sido ensayadas, tales como la fertilización *in vitro* (FIV), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y la activación partenogénica. Aunque parece posible, la IVF no ha tenido éxito en el conejo, posiblemente debido a la falta de un eficiente sistema de capacitación *in vitro* para espermatozoides de conejo vinculado a la baja permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide de conejo. Del mismo modo, ICSI ha sido ampliamente utilizado en conejo para estudiar al ovocito, su fertilización y el desarrollo embrionario. Sin embargo, esta técnica es difícil de realizar debido a que los ovocitos de conejo poseen gránulos oscuros en el plasma y fácilmente lisan y mueren después del proceso de ICSI; presentando en conejos una tasa de éxito menor al 4%. Algunos estudios han empleado la técnica de activación partenogénica como una herramienta alternativa para evaluar la competencia de los ovocitos y en el desarrollo *in vitro* en el conejo. Sin embargo, una limitación sustancial de esta técnica es que no se puede obtener descendencia hasta este momento (Salvador y Jiménez 2013).

El desarrollo alcanzado en la tecnología reproductiva permite, hoy, de un lado mejorar las posibilidades de mejora y difusión genética de las líneas comerciales, y de otro conservar y caracterizar los recursos genéticos de esta especie. Así, la IA ha contribuido notablemente al desarrollo de la cunicultura industrial, mientras que técnicas como la criopreservación de espermatozoides o de embriones han contribuido a generar bancos de germoplasma tanto de líneas comerciales como de algunas razas, favoreciendo en ocasiones la difusión y el conocimiento genético, y en otras la conservación frente a posibles epizootias o pérdidas de patrimonio genético (Jiménez y Vicente, 2012).

2.7 CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA

Las biotecnologías reproductivas han sido desarrolladas como aplicaciones de rutina tanto para propagar de forma segura el material genético entre las poblaciones reproductoras como de acortar los intervalos generacionales y de selección. El semen es todavía el componente "más barato" de la cría artificial, algo que explica el predominio de AI sobre cualquier otra biotecnología reproductiva (Rosato y Iaffaldano 2011).

Si bien es cierto que tanto la refrigeración como la congelación inducen cambios en la funcionalidad espermática parecidos a la capacitación en numerosas especies domésticas, el proceso de criopreservación produce mayor disminución de la fertilidad, respecto a la refrigeración, probablemente a causa de la combinación de alteraciones en la funcionalidad con una pérdida de la viabilidad de los espermatozoides debido al daño estructural que ha de soportar la célula durante el proceso congelación/descongelación (Medrano, 2005).

Para conservar la viabilidad de los espermatozoides durante períodos prolongados es necesario reducir su actividad metabólica, mediante la reducción de la temperatura (Najarro, 2004).

2.7.1 Conservación de espermatozoides de conejo mediante refrigeración

En 1776, Lazzaro Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos. Fue en 1956 que Harrop logra la primera preñez con semen refrigerado abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (Stornelli *et al.*, 2001).

A diferencia de otras especies, los espermatozoides de conejo presentan una baja permeabilidad al agua y un alto coeficiente de activación de energía; razones por las cuales la supervivencia espermática resulta inferior al utilizar técnicas como la criopreservación (Ferrian, 2007).

Actualmente, la IA en conejos se realiza generalmente con semen refrigerado almacenado por períodos cortos de tiempo (menos de 36 horas) con buenos resultados en la fertilidad y prolificidad respecto al semen congelado (Lavara *et al.*, 2013). Resultados que pueden estar relacionados con la cantidad de colesterol contenido en sus membranas, el cual es el doble respecto a otras especies como el bovino y ovino. Lo cual los hace menos susceptibles a los daños generados por el choque de frío (Mocé, 2014).

El-Kelawy *et al.*, 2012 evaluaron la viabilidad y capacidad fecundante de espermatozoides de conejo almacenados durante 48 horas a 5°C de refrigeración; además de prolificidad por camada. Para ello se reportó un 55.33% de movilidad, 56% viabilidad espermática hasta las 48 horas de refrigeración; y con 5.79 gazapos por camada en hembras inseminadas artificialmente para el mismo tiempo de conservación.

Roca *et al.*, 2000 evaluaron la viabilidad espermática a 15°C de refrigeración durante 96 horas, así como la tasa de fertilización en hembras inseminadas artificialmente; encontrando porcentajes de movilidad, integridad de membrana plasmática y acrosomas normales de hasta 75% a las 48 horas de conservación. Posterior a ese tiempo los mismos parámetros se redujeron drásticamente. Con respecto a la fertilidad en las hembras, solo se inseminaron con semen refrigerado a 0, 24 y 48 horas, resultando en 7 gazapos por camada para cada uno de los tiempos evaluados.

Rosato y Iaffaldano 2011 evaluaron parámetros espermáticos como movilidad masal, movilidad progresiva, viabilidad e integridad de la membrana a temperaturas de 5°C y 15°C hasta 196 horas de refrigeración sometidos a dos diferentes diluyentes que fueron: (1) Tris + ácido cítrico + glucosa y (2) Cunigel, como medio comercial. Los resultados mostraron que los parámetros evaluados en 5°C presentan mayores porcentajes de calidad espermática respecto a los evaluados a 15°C, a su vez, dicha calidad se mostró aceptable hasta las 48 horas de refrigeración, con 75.8% de movilidad masal, 46.7% de movilidad progresiva, 77.1% de viabilidad y 68.9% de integridad acrosomal utilizando el diluyente comercial.

La técnica de refrigeración permite reducir la tasa de metabolismo celular permitiendo mantener la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides, posibilitando la realización del traslado y la difusión de semen para uso, (Rebollar 2005) el cual depende de la capacidad de los diluyentes para proporcionar un entorno adecuado para el metabolismo de los espermatozoides (El-Kelawy *et al.*, 2012).

2.7.2 Efecto de la refrigeración sobre el espermatozoide.

La capacidad de los espermatozoides de conejo para sobrevivir *in vitro* después de su conservación, mediante métodos de refrigeración o congelación es limitada (Sariozkan 2014), atribuible a alteraciones en su fisiología y viabilidad y en consecuencia una disminución en los porcentajes de fertilidad (El-Kelawy *et al.*, 2012). El estrés oxidativo puede considerarse como uno de los factores más relacionados con la aparición de estas alteraciones y es producido como resultado del incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) a causa del choque térmico y la alteración de la disponibilidad y funcionalidad de los antioxidantes endógenos a causa de la remoción del plasma seminal (Restrepo *et al.*, 2012)

Los ERO pueden generarse en la célula, a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos. Cualquier proteína o sistema enzimático con la capacidad de transferir electrones puede generar ERO como subproductos de la reacción de transferencia electrónica. La principal fuente de ERO en las células es la mitocondria. Datos cuantitativos, obtenidos de mitocondrias aisladas, sugieren que alrededor del 2-6% del consumo de oxígeno se debe a la producción de $O_2^{\cdot-}$, y el 80% de éste se genera en la mitocondria a nivel de la cadena respiratoria. El oxígeno molecular (O_2) actúa como aceptor final de los electrones en la citocromo oxidasa (complejo IV), que cataliza la oxidación del oxígeno a agua. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la reducción incompleta del oxígeno puede darse a nivel de los diferentes complejos, que pueden catalizar transferencias de uno o dos electrones, con la consiguiente generación de ERO (Cámara, 2005), donde los principales EROS son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}), alkosil (RO^{\cdot}), hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son consideradas las ERO biológicamente más importantes (Rizzo *et al.*, 2012; Hancock *et al.*, 2001). Cuando las ERO

exceden a los sistemas de defensa, se provoca un estado que se denomina estrés oxidativo. El estrés oxidativo se produce al generarse una cascada de eventos intracelulares que puede resultar o en la adaptación o en el daño celular. En el primero de los casos, se obtiene la regulación de los elementos que forman parte del sistema de defensa antioxidante, esto, en un intento por restaurar el balance oxidante/antioxidante de la célula. Sin embargo en el segundo de los casos, el estrés oxidativo puede provocar daños o incluso la muerte celular (Arenas *et al.*, 2014).

En la célula existen diferentes sistemas que contrarrestan la generación de ERO, ya sean los constituidos por moléculas capaces de eliminar directamente las ERO, como los basados en sistemas enzimáticos que actúan en cascada para eliminar rápidamente el O_2^{\bullet} y sus metabolitos. Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos tipos: los sistemas de defensa primario y secundario. Entre los sistemas antioxidantes primarios se encuentran aquéllos capaces de interceptar las ERO evitando la producción de nuevos radicales libres y el daño consiguiente a estructuras celulares. Entre ellos se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (Gpx), la catalasa y la tioredoxina reductasa (Kinnula y Crapo, 2004). Los sistemas antioxidantes secundarios son moléculas que actúan atrapando radicales libres evitando así, que éstos inicien reacciones en cadena que podrían dañar estructuras celulares. Algunos ejemplos son la vitamina E, vitamina C, beta-carotenos, ácido úrico, bilirrubina, y albúmina (Jacob *et al.*, 1995).

Los espermatozoides producen espontáneamente una variedad de ERO, incluyendo el O_2^{\bullet} y el H^2O^2 . Producidas en pequeñas cantidades, las ERO son funcionalmente importantes en la conducción de las cascadas de fosforilación de tirosina asociado con la capacitación espermática. Sin embargo, cuando la producción de ERO supera las limitadas defensas antioxidantes del espermatozoide, se induce un estado de estrés oxidativo (Guthrie y Welch, 2012), siendo una amenaza, más que para cualquier otra célula, debido al gran contenido de ácidos grasos en su membrana plasmática de los espermatozoides, provoca que sean particularmente susceptibles a ERO (Chabory *et al.*, 2010). Estas pueden reaccionar con un amplio rango de moléculas biológicas como los ácidos grasos insaturados de las membranas, los sulfhidrilos de las proteínas y los ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la refrigeración). Esta susceptibilidad al frío viene determinada por el contenido de colesterol en las membranas y por la proporción de ácidos grasos poliinsaturados que están presentes en los fosfolípidos, ya que ambos fenómenos influyen en la fluidez de las membranas celulares. Otros de los daños que se presentan son la degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso; asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico. La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucólisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y por ello, la pérdida de la movilidad. Por otra parte, el ADN sufre degeneración. Las alteraciones bioquímicas del espermatozoide están causadas sobre todo por la pérdida de la selectividad de la membrana y por la pérdida de enzimas y de fosfolípidos.

Las alteraciones de la morfología del acrosoma son debidas a procesos fisiológicos asociados, por un lado al envejecimiento de la célula espermática, y por otro, al proceso de fertilización. No obstante, también se producen cambios en el acrosoma como consecuencia del choque por frío (Almela, 2014).

2.8 DILUYENTES

Con el objetivo de superar los diferentes daños a la integridad del espermatozoide, se han agregado extensores o diluyentes durante su almacenamiento en refrigeración (Sariozkan, 2014). El diluyente se define como una solución acuosa que permite, además de incrementar el volumen del eyaculado, mantener la funcionalidad de la célula espermática hasta el momento de su utilización, rentabilizando al máximo el eyaculado y optimizar el manejo del semental (Buxadé y Sánchez, 2000).

2.8.1 Características de los diluyentes

El diluyente proporciona beneficios como: proveer de nutrientes para la obtención de energía, proteger al espermatozoide del choque por frío, control de las fluctuaciones del pH a través de su capacidad tampón, mantenimiento de un apropiado balance osmótico e inhibición del crecimiento bacteriano (Althouse GC, 1997) permitiendo mantener la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante varios días.

Algunas características que deben tener los diluyentes:

- Deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres).
- Capacidad amortiguadora (evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides).
- Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico.
- Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.
- Controlar contaminantes microbianos.
- Debe preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efecto sobre la fertilidad (Carpio, 2015).

2.8.2 Componentes de los diluyentes

La mayoría de los diluyentes se formulan para mejorar la capacidad de conservación, proporcionando fuentes de energía (glucosa); sales tampón como protectores para evitar cambios de pH (sodio, bicarbonato, Tris hidroximetil aminometano (TRIS), sales básicas (NaCl, KCl) para mantener un adecuado equilibrio osmótico y antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano (De Ambrogi *et al.*, 2006).

2.8.3 Suplementos

Tanto la yema de huevo (YH) como la leche descremada (LD) han sido utilizado como componentes del diluyente generalmente para la conservación mediante congelación y refrigeración (Allai *et al.*, 2015).

2.8.4 Yema de huevo

La YH constituye alrededor de un tercio del huevo y contiene tres cuartos de las calorías (Cuadro 1), la mayoría de las vitaminas y los minerales y el total de los lípidos (Arzeni, 2014).

Cuadro 1. Composición centesimal de nutrientes de la yema de huevo.
Modificado de USDA 2013.

Nutriente	Unidad	Cantidad
Agua	g	52.31 ± 0.204
Energía	Kcal	322
Proteínas	g	15.86 ± 0.087
Lípidos	g	26.54 ± 0.240
Azúcares	g	0.56
Minerales		
Calcio, Ca	mg	129 ± 2.670
Hierro, Fe	mg	2.73 ± 0.144
Magnesio, Mg	mg	5.00 ± 0.225
Fósforo, P	mg	390 ± 9.897
Potasio, K	mg	109 ± 3.859
Sodio, Na	mg	48 ± 1.657
Zinc, Zn	mg	2.30 ± 0.085
Selenio, Se	µg	56.0 ± 8.030
Vitaminas		
Acido pantoténico	mg	2.990
Colina	mg	820.2
Vitamina B12	µg	195 ± 0.316
Vitamina A	UI	1442
Vitamina E	mg	2.58
Vitamina D	UI	218
Lípidos		
Ácidos grasos saturados	g	9.551
Ácidos grasos monoinsaturados	g	11.738
Colesterol	mg	1085

La YH ha sido utilizada como crioprotector no permeables, los cuales al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo su estructura de la acción del frío. En ningún momento atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular o especificidad. Destacan por su utilización los azúcares como la sacarosa, trehalosa, glucosa, lactosa, manosa, así como la yema de huevo y el polietilenglicol (Di Lorio, 2014).

Se ha demostrado que la YH aumenta la capacidad fertilizante del espermatozoide cuando está presente en diluyentes para almacenamiento a temperatura ambiente y parece disminuir el daño celular durante la refrigeración y la congelación. La YH se utiliza a una concentración de 20% (v / v) en el diluyente y la evidencia indica que las lipoproteínas de baja densidad (LDL), son los constituyentes responsables de la protección a los espermatozoides. Sin embargo, el mecanismo por el cual proporcionan esta protección no se ha esclarecido (Bergeron y Manjunath, 2006). No obstante, se han propuesto varios mecanismos por los cuales la YH brinda protección al espermatozoide en el proceso de refrigeración: i) las lipoproteínas de baja densidad secuestran las proteínas del plasma seminal, las cuales han demostrado participar en la salida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas conduciendo a la desestabilización de la misma (Krishnakumar *et al.*, 2011), ii) las lipoproteínas de baja densidad se intercalan entre los lípidos de membrana, evitando su desestabilización y la de las proteínas membranales, bloqueando así la entrada de iones de calcio a la célula (Olivares, 2012) y iii) LDL forman una película protectora sobre la superficie de espermatozoide o mediante la sustitución de los fosfolípidos de la membrana espermática que se dañan o pierden durante el proceso de criopreservación (Bergeron y Manjunath 2006).

2.8.5 Leche descremada

La composición de la leche y las características de sus constituyentes determinan su calidad nutritiva. Además de carbohidratos, lípidos, agua, vitaminas y sales minerales, la leche contiene proteínas en una proporción de 30 a 35g/litro, constituyendo ésta la fracción más compleja. Dentro de esta fracción pueden distinguirse las caseínas, que son un grupo de proteínas

específicas de la leche (Walstra y Jenness, 1984). Bajo esta denominación de caseínas se incluyen 4 tipos de cadenas polipeptídicas: α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína y κ -caseína (Swaisgood, 1992). En general, las caseínas tienen bajos niveles de estructura secundaria y terciaria, lo que les confiere gran flexibilidad y una estructura fácilmente desnaturalizable por agentes como la temperatura y susceptible a la acción de las enzimas. Los residuos hidrofóbicos, polares y cargados no se distribuyen uniformemente en las moléculas sino que se concentran en zonas hidrofóbicas o hidrofílicas, confiriendo a sus estructuras un fuerte carácter anfipático (Fox y Kelly, 2004).

En la leche, las caseínas forman asociaciones coloidales llamadas micelas, que son complejos esféricos y liófilos, con un 92% de proteína y un 8% de sales inorgánicas. Constituidas por un centro interno e hidrofóbico de proteínas (núcleo) rodeadas por una cobertura anfifílica (corteza), cuyas proteínas son diferentes a las que constituyen el centro (Ferrandini *et al.*, 2006).

La leche que ha pasado por tratamientos a temperaturas ultras altas (UHT), ha demostrado ser un componente eficaz del diluyente para el almacenamiento de semen fresco y almacenado, al considerarse un componente estéril y poder ser utilizado directamente sin algún tratamiento adicional. Se ha sugerido que las micelas de caseína y la lactosa presentes en la leche, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas presentes en el plasma seminal (BSP), que tras la eyacuación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas (Carpio, 2015; Allai *et al.*, 2015; Harue *et al.*, 2105). Bergeron y Manjunath, 2006, demuestran que las micelas de caseína presentan en la leche son responsables de la protección de los espermatozoides durante el almacenamiento de semen de toro; mencionan además que, la acción protectora de la leche en el espermatozoide, es análoga a la acción protectora de la yema de huevo, impidiendo la unión de las proteínas BSP a los espermatozoides, reduciendo la pérdida de lípidos membranales y mantener así la movilidad y viabilidad espermática durante el almacenamiento. Los mismos autores señalan que, curiosamente, mientras que la protección de los espermatozoides brindada por la yema de huevo implica el secuestro de las proteínas BSP por las LDL presentes en el huevo (interacción proteína-lipoproteína), la protección proporcionada por la leche, no implica

la participación de lípidos o lipoproteínas. Se trata de las micelas de caseína presentes en la leche, las que secuestran las proteínas BSP (interacción proteína-proteína). Otra de la hipótesis respecto al efecto protector de la leche es la interacción lipoproteínas -proteínas BSP, secuestrando estas últimas. Esta hipótesis está siendo investigada actualmente. (Bergeron A y Manjunath P, 2006).

2.9 SINCRONIZACION DE CELO

Las funciones de reproducción de las conejas no están estrictamente relacionadas con la receptividad sexual y las hembras pueden ovular en cada fase sexual, pero el rendimiento en la reproducción aumenta en las hembras receptivas. Se han formulado varias propuestas para sincronizar la receptividad sexual. El uso de hormonas para sincronizar el celo se halla ampliamente difundido debido a su simplicidad y eficacia; siendo la Gonadotrofina sérica de yegua gestante (PMSG), también denominada Gonadotrofina coriónica equina (ECG) la hormona más utilizada en la cría industrial de conejos. Su principal acción de la gonadotrofina es la de aumentar la liberación de estrógenos de los folículos presentes en los ovarios, promoviendo el crecimiento folicular y consecuentemente un incremento de la respuesta ovulatoria (Castellini, 1996).

Sin embargo, la evolución previsible de las normas sobre el uso de hormonas exógenas ha dado lugar a la investigación sobre métodos alternativos denominados “Bioestímulos” para la mejora de la receptividad sexual de las conejas y, como consecuencia de su productividad. (Rebollar *et al.*, 2006).

Estos métodos llevados a cabo antes de la inseminación debe ser fácil de usar, de bajo costo, compatible con el bienestar de los animales y presentar adaptabilidad a la producción cíclica. En el caso de las conejas lactantes, uno de los métodos más empleados es la separación transitoria de la camada o destete transitorio durante un periodo corto de tiempo, previo a la IA (Alvariño *et al.*, 1998). Este manejo genera una reducción de los niveles séricos de prolactina, disminuyendo así el efecto inhibitorio que ejerce esta hormona en la función reproductiva. De

esta forma, mejora la secreción de FSH y los mecanismos relacionados con la actividad folicular y esteroidogénica ovárica que aumentan la receptividad sexual, el pico de la LH y la fertilidad en conejas lactantes bioestimuladas en el momento de la IA (Rebollar *et al.*, 2008). Además de la separación madre camada entre otras técnicas, se encuentra la manipulación de la alimentación, programas de iluminación, proximidad de los machos y manipulación de los animales como el cambio de jaula (Clément, 2007). Respecto a éste último, Rodríguez-De Lara *et al* (2003) encontraron que los cambios de las conejas a otras jaulas durante 8 a 10 horas bajo un ritmo de reproducción de 4 a 11 días después del parto resultó en 86.7%% de tasa de receptividad sexual y un tamaño de camada promedio de 8.6 gazapos. Varios estudios han constatado que cambios de las conejas a otras jaulas desde 8 hasta 48 horas ofrecen buenos resultados reproductivos (Luzi y Crimella, 1998; Manal, 2010). En efecto, las modificaciones ambientales tales como la duración de la iluminación diaria, temperatura, alimentos, estrés, estimulaciones auditivas u olfativas pueden modificar el equilibrio del sistema endocrino de la hembra, y por ende el comportamiento reproductivo, regulado a través del sistema nervioso y el eje hipotálamo-hipófisis (Clément, 2007).

2.10 INSEMINACION ARTIFICIAL

Desde que Lazzaro Spallanzani en 1787 realizó la primera Inseminación Artificial (IA) con semen fresco en caninos, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de múltiples especies (Stornelli *et al.*, 2001).

En el caso de la cunicultura la AI se ha convertido en un medio eficaz y esencial para el control de programas de mejoramiento no sólo en escala experimental, sino también en unidades de producción (El-Kelawy *et al.*, 2012). La ventaja principal es la drástica reducción de los tiempos de ejecución en comparación con la monta natural, disminución significativa en los costos de alimentación, producción total, medida de bioseguridad, utilización más eficiente del semen en relación con la cría natural, donde el eyaculado de un macho por semana equivale de 20-40 dosis para su utilización, mientras que un macho utilizado para reproducción natural solo puede reproducirse dos veces a la semana (Lavara, 2013).

La introducción de la ciclicidad de la producción y la IA en “bandas” o en días fijos de la semana han mejorado de manera significativa el manejo y la productividad en las granjas cunícolas. Debido a las características particulares de esta especie, es necesario aplicar métodos de inducción de la ovulación, mediante la administración de análogos sintéticos de GnRH por vía intramuscular (IM) en el momento de la IA (Arias, 2009).

2.11 INDUCCION A LA OVULACION

El control reproductivo en el conejo ha avanzado gracias al desarrollo de tecnologías reproductivas tales como las practicas hormonales, que participan como bioestimuladores positivos respecto a la tasa de receptividad necesaria en la técnica de inseminación artificial. Los primeros ensayos con análogo de GnRH para inducir la ovulación se realizaron en 1990; desde entonces ha adquirido un mayor interés y su aplicación ha sido incorporada en la industria cunícola de manera progresiva (Vicente *et al.*, 2008).

La ovulación en las conejas en el estado de reproducción natural es fisiológicamente inducida por el apareamiento (Dal Bosco, 2014) y / o por una sinergia entre los estímulos sensoriales y neuroendocrinos que contribuyen a la activación de las neuronas de GnRH y la generación consiguiente de un pico preovulatorio de LH de la glándula pituitaria. Los niveles plasmáticos de LH comienzan a elevarse a menos de 3 minutos después del apareamiento y llegar a una meseta dentro de los 15 a 75 min. Sin embargo, debido a la ausencia de conejos machos en la AI, la técnica estándar que se incorporó progresivamente en granjas de conejos hace más de 20 años, ofrece una inyección de análogos de GnRH (Gonadorelina, buserelina, triptorelina, lecirelina, etc.), vía IM para inducir la liberación hipofisaria de LH (Rebollar *et al.*, 2012), inmediatamente después de la IA; siendo actualmente el método más usado para la inducción a la ovulación (Zapletal y Pavlik 2008).

2.12 FERTILIZACIÓN

La fertilización desencadena un complejo celular programado que transforma dos células germinales altamente especializadas, el ovocito y el espermatozoide, en un embrión totipotente (Peña, 2015).

La fertilización es definida como el proceso en el cual un gameto haploide masculino interactúa con uno femenino para formar un cigoto diploide. En este evento el espermatozoide realiza dos grandes contribuciones: proporciona el material genético paterno al ovocito e inicia la ruta de señalización intracelular que permite la activación del ovocito y el desarrollo del embrión, aportes sin los cuales la fertilización no podría darse (Martínez y Pardo 2010).

Debido a que la fertilización ocurre en el ampulla, el transporte sincronizado de los óvulos hacia la parte baja del tracto reproductor de la hembra debe de coincidir con el transporte de las células espermáticas desde el sitio de deposición. Para lo cual, participan mecanismos cuidadosos de control para que los óvulos y espermatozoides sean transportados en direcciones opuestas durante un periodo limitado de tiempo. En el conejo, el tiempo de transportación desde el infundíbulo hasta el sitio de fertilización es de 6 minutos, después de la ovulación. El transporte a través de la primera parte del ampulla es realizado primariamente por la acción ciliar. El transporte a lo largo de la parte restante del ampulla es mediante contracciones peristálticas y segmentales musculares, además de acción ciliar. En conejos, los espermatozoides alcanzan la unión útero-oviducto en unas 4 a 5 horas (Alvariño, 2000).

Durante el proceso de fertilización, el espermatozoide interacciona con el óvulo a tres diferentes niveles: i) con las células del cúmulo, ii) con la zona pelúcida y iii) con la membrana plasmática. Esta última involucra una serie de interacciones moleculares complejas por las cuales la unión inicial del espermatozoide al óvulo pasa a ser una firme adhesión célula-célula y culmina en la formación de una sola célula (Caballero y Villa, 2010).

La unión del espermatozoide al ovocito está mediada por receptores y ligandos con gran afinidad presentes en la superficie de ambos gametos. La primera interacción espermatozoide-ovocito

está mediada por carbohidratos de la ZP y proteínas tipo lectinas localizadas en la superficie de la cabeza del espermatozoide (Dean, 2004). Tras el primer contacto del espermatozoide con la ZP del ovocito se presenta la RA; sólo los espermatozoides que presentan RA en el momento de contactar con la ZP pueden penetrar la ZP, debido a la acción de enzimas acrosómicas. Así, sólo el espermatozoide que ha llevado a cabo la RA puede fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Una vez concluida la RA en el espermatozoide, tiene lugar una segunda interacción espermatozoide-ovocito que está mediada por la glicoproteína ZP2 y la proteína PH-20. Tras la RA y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa el espesor de la misma para alcanzar el espacio perivitelino (EPV) y contactar con el oolema. Una vez el espermatozoide se encuentra en el EPV, la membrana plasmática del segmento ecuatorial de éste se une a la membrana plasmática (oolema) del ovocito, dando lugar a la fusión de las mismas. Este proceso está regulado por una serie de proteínas localizadas en el propio oolema como: P-GPI, tetraspaninas y proteínas integrinas; y en la región ecuatorial del espermatozoide: ADAM, CRISP, proteína Izumo, enzima mSLLP1 y proteínas chaperonas (Myles y Primakoff, 1997). La fusión de gametos regulada por estas proteínas da paso a la reanudación y complementación de la segunda división meiótica con extrusión del segundo cuerpo polar (Cole y Cupps, 1977). En conejos, la fertilización se produce dentro de las 6 horas que siguen a la ovulación, o bien entre 12 o 13 horas después la cubrición (Alvariño, 2000).

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la estacionalidad reproductiva en las conejas, la falta de selección genética deseable, además del desinterés por la generación de conocimientos relacionados a aspectos reproductivos, se ha propiciado un progreso limitado en la actividad productiva y reproductiva de la especie cunícola.

En la cunicultura, la inseminación artificial (IA) posee gran importancia, principalmente para fines de selección genética. Sin embargo, no se llevan a cabo protocolos adecuados y satisfactorios con base a una evaluación eficaz de los eyaculados, ni de su conservación; siendo la valoración de la calidad espermática una de las herramientas de evaluación más empleadas en la selección de los reproductores. En estas condiciones, surge la necesidad de establecer un protocolo de conservación que permita mantener viables a las células espermáticas como ha sucedido en otras especies productivas. El presente trabajo considera la conservación del semen de conejo mediante refrigeración, evaluando la calidad de dos diferentes diluyentes mediante su capacidad para alargar la viabilidad y funcionalidad de las células espermáticas del conejo, así como el tiempo óptimo de refrigeración. Además, se requiere evaluar si existe una relación entre la fertilidad, prolificidad y la calidad espermática entre cada uno de los diluyentes, al emplear el semen refrigerado para su aplicación en la IA.

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de dos diferentes diluyentes para la conservación seminal hasta las 24 horas en refrigeración (5°C), sobre la calidad espermática del conejo y los parámetros de fertilidad y prolificidad de las hembras inseminadas artificialmente con el semen refrigerado.

4.2 Objetivos específicos

Determinar el tipo de diluyente y tiempo de conservación óptimos con base a la funcionalidad de la célula espermática del conejo.

Evaluar si la calidad espermática del conejo se ve modificada respecto a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de almacenamiento a 5°C.

Evaluar la fertilidad y la prolificidad de las conejas inseminadas artificialmente con semen refrigerado a 5°C durante 2, 8, y 24 horas.

CAPÍTULO V. HIPÓTESIS

Si el diluyente es uno de los factores que influyen en la tolerancia del espermatozoide a la conservación a bajas temperaturas (5°C), entonces el mantenimiento de las características espermáticas óptimas y la capacidad fecundante de los espermatozoides, se deberán a la diferencia entre los componentes del medio dilutor y de su capacidad para evitar las diferentes alteraciones a la integridad del espermatozoide, durante su almacenamiento en refrigeración.

Capítulo VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 GRUPOS EXPERIMENTALES E INSTALACIÓN

6.1.1 Machos

Para la obtención de los eyaculados, se utilizaron 4 conejos de la raza Nueva Zelanda Blanco, mayores de 7 meses de edad, sexualmente maduros y de fertilidad probada (descendencia comprobada), clínicamente sanos y con un peso corporal promedio de 4.0 Kg.

Se manejaron en instalaciones con ventilación natural y fueron mantenidos bajo un régimen de luz natural (12HL/12HO). Todos los animales fueron alojados individualmente en jaulas metálicas de alambre galvanizado, con medidas de 60 x 35 x 30 cm, dispuestas en “flat-deck” (horizontal), con comederos tipo tolva y bebederos manuales.

6.1.2 Hembras

Para la IA se utilizaron 35 conejas primíparas de la raza Nueva Zelanda Blanco, mayores de 5 meses de edad, con fertilidad probada, clínicamente sanas y con un peso corporal promedio de 3.2-3.5 Kg.

Se mantuvieron en instalaciones con ventilación natural, bajo un régimen de luz artificial (16HL/8HO). Las conejas fueron alojadas individualmente en jaulas metálicas de alambre galvanizado, con medidas de 60 x 35 x 30 cm, equipadas con nidos internos, dispuestas en “flat-deck” (horizontal, un solo nivel), con comederos tipo tolva y bebederos automáticos.

6.2 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio fue dividido en dos experimentos con una localización diferente para la realización de los objetivos planteados.

El primer experimento consistió en la evaluación *in vitro* de las muestras seminales (eyaculados). Su obtención se realizó en las instalaciones de la Granja de producción animal de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa y el procesamiento de las mismas se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa. Localizada a 19°21' N y 99°05' O a una elevación de 2,240 msnm.

El segundo experimento consistió en la determinación de la fertilidad y prolificidad *in vivo* de hembras inseminadas artificialmente con semen refrigerado en cada uno de los diluyentes y mantenido en diferentes tiempos (2-24 horas). Se realizó en una unidad de producción cunícola ubicada en el Municipio de Texcoco, Estado de México. Localizado a 19° 17' latitud norte y 98° 53' latitud oeste, a una elevación de 2,240m sobre el nivel del mar msnm.

6.3 ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

El alimento ofrecido tanto para las hembras y como para los machos fue una dieta comercial peletizada marca Malta Cleyton línea Conejo Ganador (Proteína mínima 16%, grasa mínima 2.5%, humedad máxima 12%, ceniza máxima 10%, SLN mínimo 43.5%). Durante toda la fase experimental, se ofreció agua y alimento a libre acceso.

6.4 PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO.

EVALUACIÓN BÁSICA DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

6.4.1 Diluyentes

Los cuadros 2 y 3 muestran los componentes incluidos en los diluyentes utilizados para la conservación seminal.

Cuadro 2. Componentes y cantidad de inclusión del diluyente a base de Tris + yema de huevo (TY)

Componente	Cantidad
Tris	0.7261 g
Ácido cítrico	0.3360 g
Fructosa	0.3191 g
Yema de huevo	20%
Agua destilada	25 ml

Cuadro 3. Componentes y cantidad de inclusión del diluyente a base de Tris + leche descremada (TL)

Componente	Cantidad
Tris	0.7261 g
Ácido cítrico	0.3360 g
Fructosa	0.3191 g
D-glucosa	1.225 g
Leche en descremada en polvo	0.6 g
Agua destilada	25 ml

6.4.2 Inspección sanitaria de los sementales

Antes de la extracción de los eyaculados para la realización de la primera etapa del experimento, se procedió a la inspección sanitaria de los animales, la cual consiste en la evaluación de ausencia de llagas en las patas, secreción en mucosas nasales y oculares, las cuales evidencian problemas de tipo respiratorio; así mismo revisión de la zona perianal, evaluando la ausencia de secreciones mucoides y/o diarrea, las cuales se presentan cuando existen procesos infecciosos de tipo digestivo. Por último, se procede a inspeccionar los genitales, los cuales deben estar ausentes de cualquier lesión o infección, ya que la inflamación presentada por estas afectaciones, puede reducir drásticamente la integridad del acrosoma por incrementar la producción de radicales libres. Posterior a la inspección sanitaria, se procede al pesaje de los animales y su registro.

6.4.3 Extracción de los eyaculados

Se obtuvieron 13 eyaculados. Para la extracción de los eyaculados, los machos fueron condicionados durante 5 semanas con el empleo de una vagina artificial tipo Francés y una hembra como estímulo sexual.

Para la toma de muestra se le permitió al macho montar a la hembra y se colocó debajo de ella la vagina artificial (diseñada para conejos), la cual consta de un cuerpo semi-rígido, un revestimiento interno o capote (látex o goma) y un tubo colector. La vagina contiene agua caliente a 45°C entre el cuerpo semi-rígido y el revestimiento interno para producir el estímulo de calor necesario para que el macho eyacule (Lavara *et al.*, 2003).

Fueron utilizados cuatro machos para la obtención de los eyaculados. El ritmo de extracción fue de 2 extracciones por macho por semana, alternando 2 días entre una extracción y otra. También fueron establecidos criterios de inclusión de los eyaculados para su utilización (Cuadro 4).

Cuadro 4. Criterios establecidos para incluir un eyaculado en el estudio (Alvariño, 2000).

Criterio	Parámetro
Color	Blanco - nacarado
Aspecto	Líquido - lechoso
Movilidad masal - categoría 4	80%*
Movilidad masal - categoría 5	100%*
Movilidad progresiva	≥80% - 90%
Viabilidad	≥80%
Morfología normal	≥70%

*: Proporción de espermatozoides móviles

6.4.4 EVALUACION BÁSICA DE CALIDAD SEMINAL

La evaluación básica de la calidad seminal consiste en determinar las características tanto macroscópicas como microscópicas del eyaculado, las cuales se realizan observando a simple

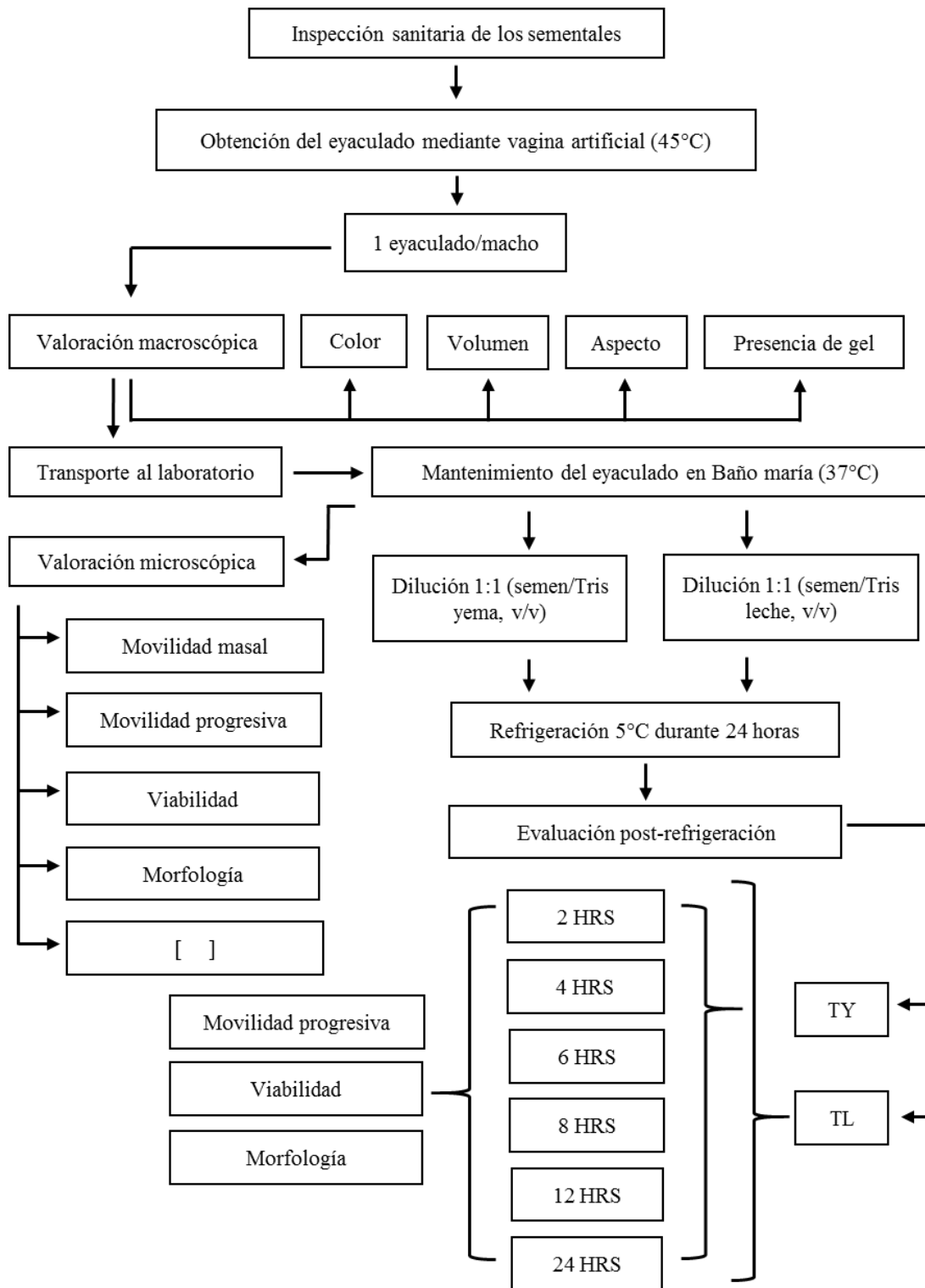
vista el eyaculado obtenido y posteriormente, evaluando la calidad de los espermatozoides con la ayuda del microscopio. Las características a evaluar se describen a continuación.

6.4.5 Evaluación macroscópica

Una vez obtenidos los eyaculados, se procedió a su valoración macroscópica (Esquema 1). Las determinaciones fueron: presencia de gel, volumen del eyaculado, color y aspecto. Los eyaculados que presentaron gel, se les retiró inmediatamente y el volumen se midió directamente del tubo colector. La muestra fue mantenida a una temperatura de 37°C y cubierta de la luz durante su traslado al laboratorio para su posterior procesamiento. Se utilizó una bitácora de registro para cada uno de los parámetros macroscópicos (Apéndice 1).

6.4.6 Evaluación microscópica

Llegadas las muestras al laboratorio, se colocaron en baño maría a 37°C para evitar shock térmico y mantener viables a los espermatozoides durante su evaluación en fresco y posterior dilución. Los parámetros evaluados fueron: movilidad masal, movilidad progresiva, viabilidad, morfología y concentración. Se utilizó una bitácora de registro para cada uno de los parámetros microscópicos (Apéndice 2).



Esquema1. Obtención, valoración y procesamiento del semen de conejo para refrigeración y posterior evaluación post-refrigeración.

6.4.6.1 Movilidad masal

La movilidad masal espermática se determinó colocando 5µl de semen sobre un portaobjetos (sin cubreobjetos) temperado a 37°C, debidamente rotulado con fecha, número de semental y tiempo de evaluación. Posteriormente se realizó la observación al microscopio con objetivo 10x, determinando el patrón de movimiento de acuerdo a la proporción de espermatozoides móviles:

Cuadro 5. Criterios establecidos para la evaluación de la movilidad.

Categoría	% de movilidad
0	0
1	20
2	40
3	60
4	80
5	100

(Alvariño, 2000)

6.4.6.2 Movilidad progresiva

Para determinar la movilidad progresiva, se utilizó la misma muestra (5µl de semen), previamente utilizada para la evaluación de la movilidad masal; a la cual se colocó un cubreobjetos atemperado a 37°C y se realizó la observación al microscopio con objetivo 20x, determinando los patrones de movimiento progresivo, caracterizados por espermatozoides con movimiento activo; lineal o en círculos grandes independientemente de la velocidad. Categorizándolos de 0% a 100% según su movimiento. Posteriormente se registró en la bitácora (Alvariño, 2000).

6.4.6.3 Viabilidad y morfología

Los parámetros de viabilidad y morfología espermática fueron determinados colocando 5µl de semen y 2µl de solución eosina/nigrosina al 5%, realizando un frotis uniforme sobre el área completa del portaobjetos, atemperado a 37°C y debidamente rotulado con fecha, número de semental y tiempo de evaluación. Una vez secado el frotis se procedió a la observación al microscopio con objetivo 20x.

Para determinar la viabilidad se examinaron y contabilizaron 100 células, determinando el patrón de tinción de los espermatozoides. Las cabezas no teñidas del espermatozoide (blancas) se clasificaron como “vivas”. Mientras que cualquier tinte rosa o rojo en la cabeza de los espermatozoides se clasificaron como “muertos”. La viabilidad fue expresada como el porcentaje de espermatozoides vivos. La figura 1 muestra los patrones de tinción para la determinación de la viabilidad espermática.

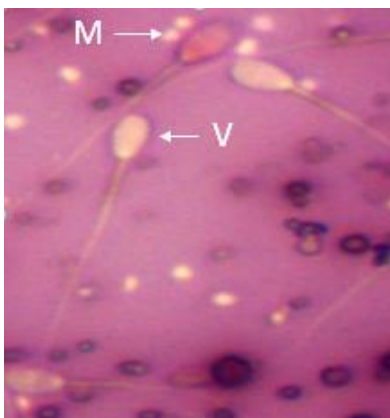


Figura 1. Espermatozoides de conejo teñidos con eosina-nigrosina para la evaluación de la viabilidad.
V) Espermatozoide vivo, M) Espermatozoide muerto.

En cuanto a la morfología, se examinaron y contabilizaron 100 células, categorizándolas, ya sea como normales o anormales, cuando presentaron anomalías de cabeza, pieza media y cola.

Para la determinación de anomalías en cabeza, se incluyeron, piriformes, macro y microcéfalas, alargadas y redondas. Las anomalías en cuello o pieza media, estuvieron representadas por espermatozoides con mala inserción de la pieza media (formando un ángulo de 90° con el eje de la cabeza), o engrosada; y para la categoría de anomalías en cola, fueron tomadas en cuenta colas quebradas, dobladas, enrolladas o dobles.

6.4.6.4 Concentración

La concentración espermática fue determinada con la utilización de cámara Neubauer. Para ello, se realizó una dilución de 995µl de agua destilada y 5µl de semen, homogenizándola de manera suave. Posteriormente fueron colocados 15µl de la dilución en cada una de las secciones de la cámara Neubauer (A y B), evitando la formación de burbujas y dejándola estabilizar durante 1 minuto para su evaluación al microscopio con objetivo 40x.

Para determinar la concentración de espermatozoides en millones por mL, se cuantificaron 5 cuadros de la cuadrícula central de las secciones A y B (10 cuadros en total). Se obtuvo la suma y promedio de los 10 cuadros y se dividió entre el factor de 0.4 (correspondiente a la dilución 1:100). El resultado se expresó en millones de espermatozoides por mL ($\times 10^6/\text{mL}$). (WHO, 2012).

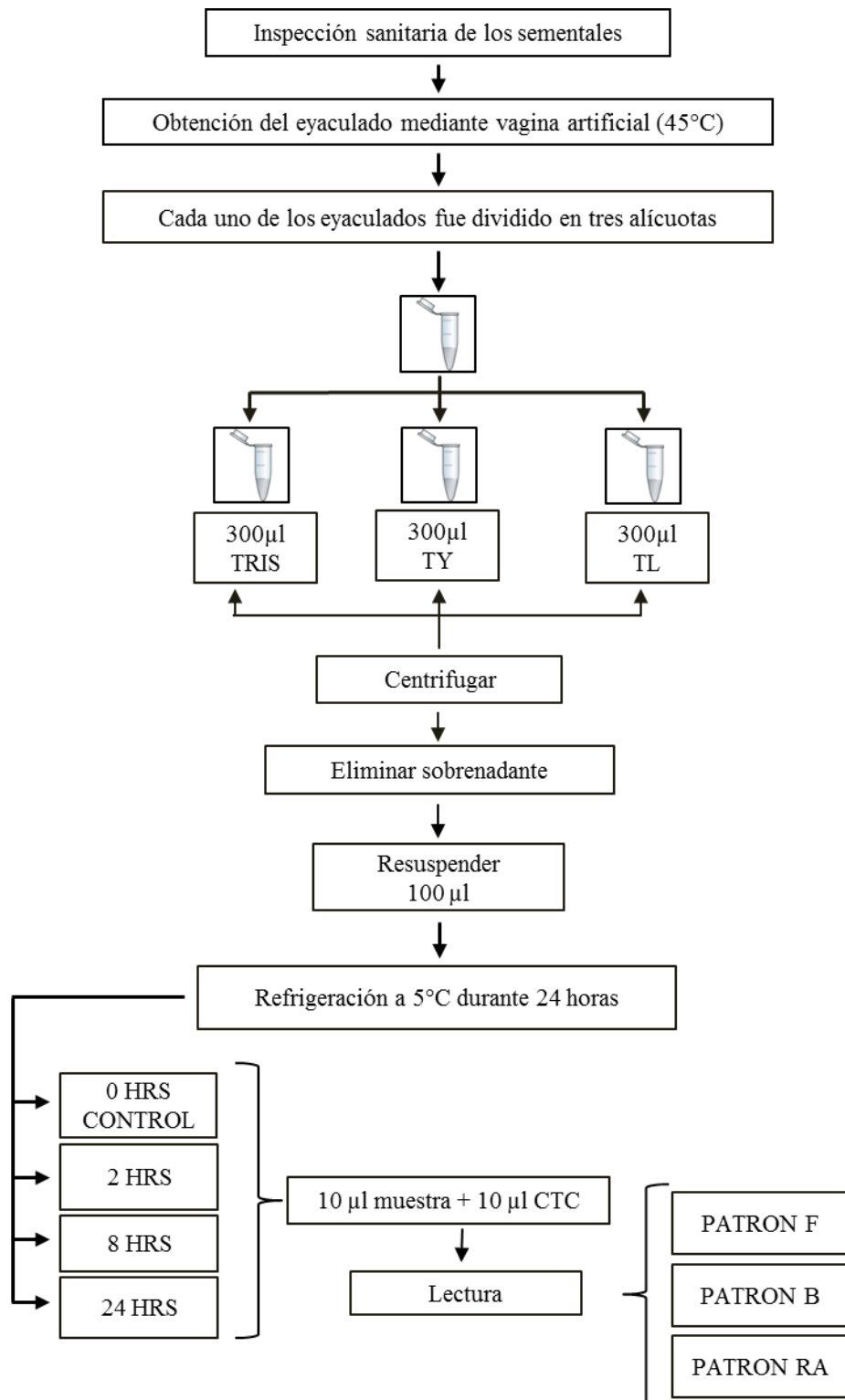
6.4.7 Procesamiento del eyaculado

Se obtuvieron 13 eyaculados. El volumen de cada uno de ellos fue dividido en dos alícuotas. Cada alícuota fue diluida en una proporción 1:1 (semen/Tris, v/v) en los diluyentes TY o TL, utilizando tubos eppendorf de 1 mL. Inmediatamente después fueron puestas en refrigeración a 5°C durante 24 horas. La velocidad de enfriamiento desde la temperatura ambiente a 5°C fue de 0.68°C/ min.

La evaluación de los parámetros de calidad espermática (movilidad progresiva, viabilidad y morfología), se llevó a cabo durante todo el tiempo de refrigeración a intervalos de 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas para cada uno de los diluyentes utilizados.

6.4.8 Evaluación macroscópica y microscópica

Una vez obtenidos los eyaculados, se aplicó el mismo procedimiento de valoración básica seminal determinando tanto parámetros macroscópicos como microscópicos (Esquema 2), y se aplicaron los mismos criterios de inclusión (Cuadro 3).



Esquema 2. Obtención, procesamiento y evaluación del semen de conejo para determinación de la integridad del acrosoma.

6.4.9 Procesamiento del eyaculado

El volumen total de cada eyaculado fue dividido en tres alícuotas utilizando tubos eppendorf de 1mL a los cuales se agregó 300 μ l de los diferentes medios utilizados, se centrifugaron durante 40 segundos y se obtuvo el paquete celular.

Posterior a la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, dejando solamente el paquete celular (espermatozoides), el cual fue resuspendido con 100 μ l de los diferentes medios a utilizar.

Inmediatamente después, las muestras espermáticas adicionadas TY y TL fueron puestas en refrigeración a 5°C durante 24 horas. La velocidad de enfriamiento desde la temperatura ambiente a 5° C fue de 0.68°C/ min.

6.4.10 Evaluación de la integridad acrosomal

Para determinar el estado del acrosoma en tiempo 0 (control), se colocaron 10 μ l de la alícuota de muestra espermática con medio Tris y 10 μ l de preparación de CTC sobre la gota de muestra espermática, haciendo un extendido sobre un portaobjetos previamente temperado a 37°C. Se dejó secar la muestra aproximadamente 3 minutos.

Posteriormente se agregaron 5 μ l de aceite de inmersión sobre el portaobjetos y fue llevado al microscópio de fluorescencia, bajo el objetivo 100x oil para la observación de los patrones de fluorescencia. Se determinaron los patrones y el estado acrosomal. Dónde: patrón F, muestra fluorescencia ligera uniformemente distribuida en toda la cabeza del espermatozoide, representando espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto; patrón B, presenta fluorescencia en la región acrosomal, representando espermatozoides capacitados con acrosoma intacto; y patrón RA, con ausencia o presencia de una fluorescencia pequeña en la cabeza, y presencia de una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial del espermatozoide, representando espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

La evaluación del estado acrosomal y su categorización se llevó a cabo durante todo el tiempo de refrigeración a intervalos de 2, 8 y 24 horas para cada uno de los diluyentes utilizados.

6.5 SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

6.5.1 Diluyentes

Los diluyentes utilizados para la conservación en refrigeración y posterior utilización en la IA fueron los indicados en el cuadro 3.

6.5.2 Extracción de los eyaculados

Se obtuvo el eyaculado mediante vagina artificial a una temperatura de 45°C. Estableciendo criterios de inclusión (Cuadro 4).

Una vez realizada la evaluación del eyaculado se prosiguió a la dilución del eyaculado con los medios TY y TL. Ajustando a 25×10^6 por dosis (0.5 ml). La temperatura del eyaculado y medio dilutor fueron mantenidas a 37°C antes y durante la dilución, evitando daño térmico por diferencia de temperaturas.

Posteriormente el volumen total (eyaculado + medio) fue puesto en refrigeración a 5°C durante 2, 8 y 24 horas. La velocidad de enfriamiento desde la temperatura ambiente a 5° C fue de 0.68°C/ min.

6.5.3 Sincronización de celo en las hembras

Para la presentación del estro, las hembras fueron sometidas a un cambio súbito de ambiente (cambio de jaula) 8 horas antes de la inseminación artificial, generando un estado de receptividad sexual.

6.5.4 Inspección sanitaria de las hembras

Las hembras utilizadas para el estudio fueron puestas bajo desparasitación (Tri-sulfa) 15 días antes de la IA.

Previo a la IA se realizó una inspección sanitaria de las hembras, la cual consistió en la observación de mucosas nasales y oculares, evaluando la ausencia de secreción sobre estas áreas, las cuales evidencian el curso de un proceso infeccioso de tipo respiratorio, además una revisión de la zona perianal, evaluando la ausencia de secreciones mucoides y/o diarrea, presentes cuando existen procesos infecciosos de tipo digestivo. Así mismo, se realizó la inspección de las tetas tanto visual como por palpación digital, para descartar la presencia de mastitis. Por último, se procedió a inspeccionar los genitales, los cuales deberán estar ausentes de cualquier lesión o infección, ya que estas podrían afectar de manera directa el resultado de la IA.

Afecciones respiratorias, digestivas o mastitis fue motivo de eliminación, dentro del grupo de hembras a inseminar.

6.5.5 Inseminación artificial

Posterior a la inspección sanitaria, se prosiguió a examinar la coloración de la vulva. La coloración ideal de la vulva de la coneja para realizar la IA, es un rojo intenso acompañado por edematización.

Antes de la inseminación con cada uno de los medios, se realizó la evaluación de la calidad espermática (movilidad progresiva, viabilidad y morfología) del semen diluido en los 2 diluyentes y refrigerado en los tiempos requeridos (2, 8, y 24 horas), así como la muestra de semen considerada como tratamiento control (semen fresco).

Posteriormente cada coneja fue colocada en un cañón (dispositivo de apoyo y sujeción). Este dispositivo consiste en una base y una pared de madera, sobre la cual se encuentra un cilindro hecho con material de PVC colocado con una inclinación de 45° respecto a la pared. Dentro del cual es introducida la hembra dejando expuestos los miembros posteriores y el área genital para facilitar el procedimiento de inseminación.

Una vez colocada la hembra en la posición correcta, se procedió a la introducción de la pistola inseminadora dentro de la vagina, depositando 0.5 ml de la muestra utilizada. Inmediatamente después se aplicó 25 UI de un análogo de GnRH para inducir la ovulación (Fertagyl®). Al término del procedimiento la hembra fue llevada a su jaula correspondiente.

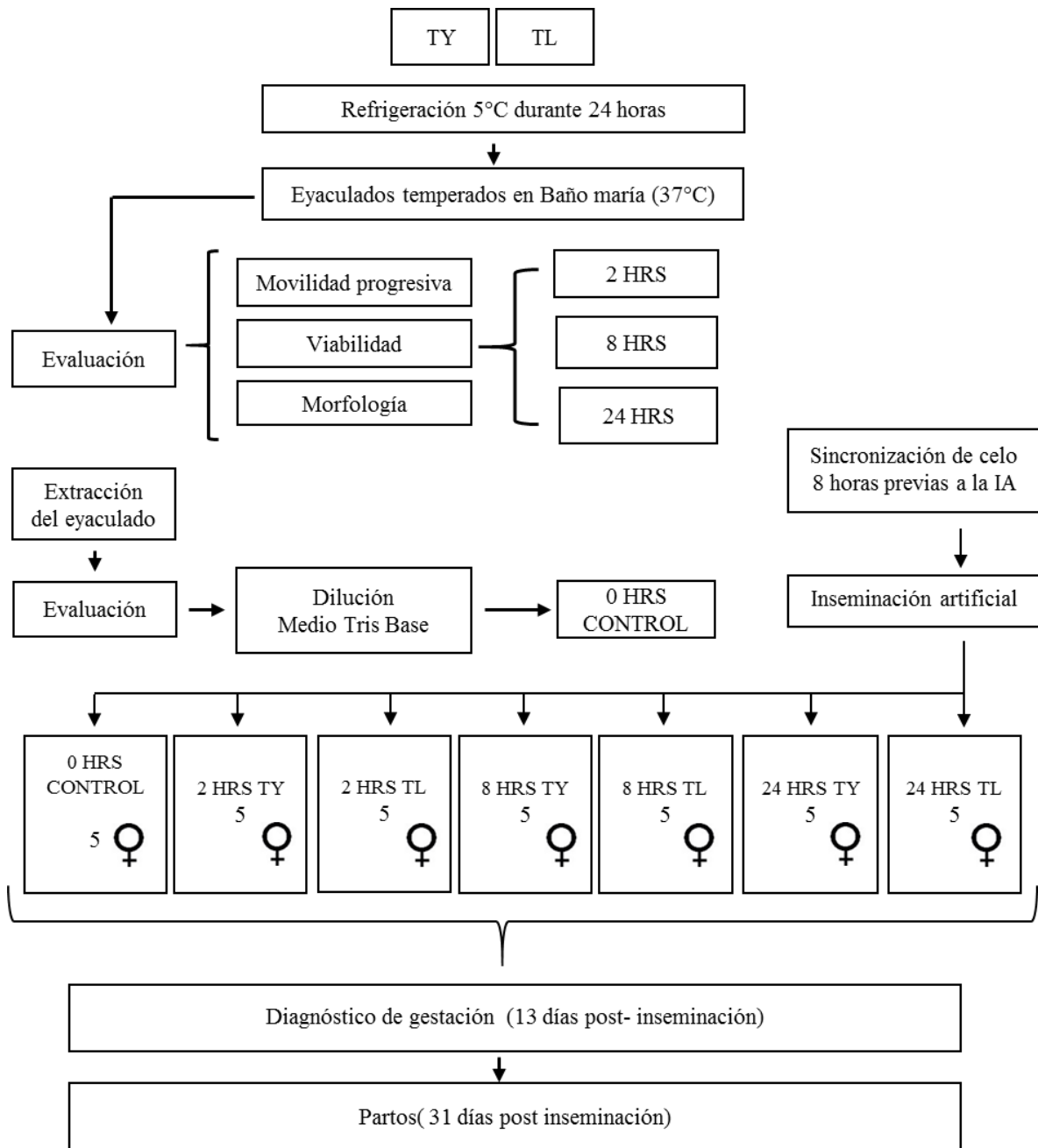
El número de hembras inseminadas fue de 5 para cada uno de los medios y tiempos establecidos. Teniendo un total de 35 hembras inseminadas (Esquema 3). Todos los datos se registraron en la bitácora de control reproductivo (Apéndice 3).

6.5.6 DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

El día 13 posterior a la IA se llevó a cabo el diagnóstico de gestación mediante palpación abdominal. A las hembras diagnosticadas como positivas (gestantes), se les colocaron un nido con viruta de madera (100 g) como sustrato al día 28 de la gestación. Se utilizó una bitácora de registro para llevar el control del diagnóstico de gestación (Apéndice 4).

6.5.7 PARTO

A los 31 días posteriores a la IA ocurrieron los partos. La información considerada y registrada (Apéndice 4), fue el número total de gazapos nacidos por camada y peso de la camada. Se utilizó una bitácora de registro para llevar el control en la sucesión de partos.



Esquema 3. Evaluación post-refrigeración de semen de conejo para su utilización en inseminación artificial.

6.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros de calidad espermática (movilidad progresiva, viabilidad, morfología normal e integridad acrosomal) se compararon entre tratamientos mediante un ANOVA. Utilizando el paquete estadístico NCSS. Un valor de P menor de 0.05 ($P < 0.05$) se consideró significativo.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

En el presente trabajo se propuso encontrar el tiempo de conservación óptimo mediante refrigeración (5°C) para el mantenimiento y funcionalidad (*in vitro*) de los espermatozoides de conejo hasta 24 horas post refrigeración, mediante la comparación del efecto de la yema de huevo y la leche descremada como parte de los componentes del medio de dilución. Posteriormente, se evaluó la capacidad fertilizante (*in vivo*) de los diferentes medios, a diferentes tiempos de conservación en conejas inseminadas artificialmente, determinada por los parámetros de fertilidad y prolificidad.

7.1 Características de los eyaculados de los conejos Nueva Zelanda Blanco

En el cuadro 5 se indican los parámetros macroscópicos y microscópicos de calidad espermática en semen fresco de conejo, los cuales mostraron una buena calidad inicial.

Cuadro 6. Indicadores espermáticos en semen fresco de conejo evaluados *in vitro*

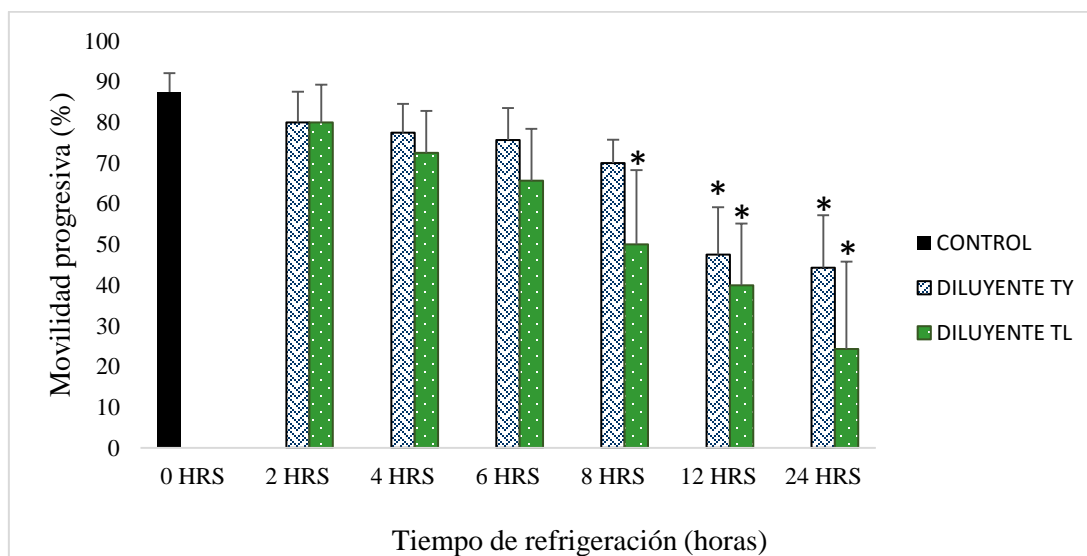
	Parámetros evaluados	Característica
Macroscópicos	Color	Blanco-nacarado
	Consistencia	Líquido lechoso
	Contenido de gel	Ausente
	Volumen	0.47 ± 0.21
Microscópicos	Movilidad masal (escala)	4
	Movilidad progresiva (%)	85 ± 4
	Viabilidad (%)	88 ± 5
	Morfología normal (%)	71 ± 7.13
	Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	283.81 ± 103.22

7.2 Efecto de la refrigeración sobre los parámetros básicos de calidad espermática

Los resultados sobre la calidad espermática hasta 24 horas de almacenamiento en refrigeración con los diluyentes TY y TL se presentan en las gráficas 1-3.

MOVILIDAD

El efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación sobre el parámetro de movilidad progresiva espermática entre TY y TL se muestra en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas) a 5°C sobre el parámetro de movilidad progresiva espermática entre diluyentes TY y TL.

*= ($P < 0.05$) se consideró significativo.

El efecto del tiempo de refrigeración utilizando el diluyente TY sobre el parámetro de movilidad progresiva espermática no mostró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tiempos 2 (80%), 4 (77.5%), 6 (75.7%) y 8 (70%) horas post-refrigeración con respecto al control (87.5%). Sin embargo a, las 24 horas de evaluación post-refrigeración, presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) de hasta un 44.3% menor respecto a las 8 horas de almacenamiento y al control, con 70% y 87.5% de movilidad progresiva respectivamente.

Se observó un comportamiento similar con la utilización del diluyente TL, el cual presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) con relación a la disminución de este parámetro hacia las 24 horas, con un 24.29% menor respecto al control (87.5%) y al tiempo 2 (80%), 4 (72.5%), 6

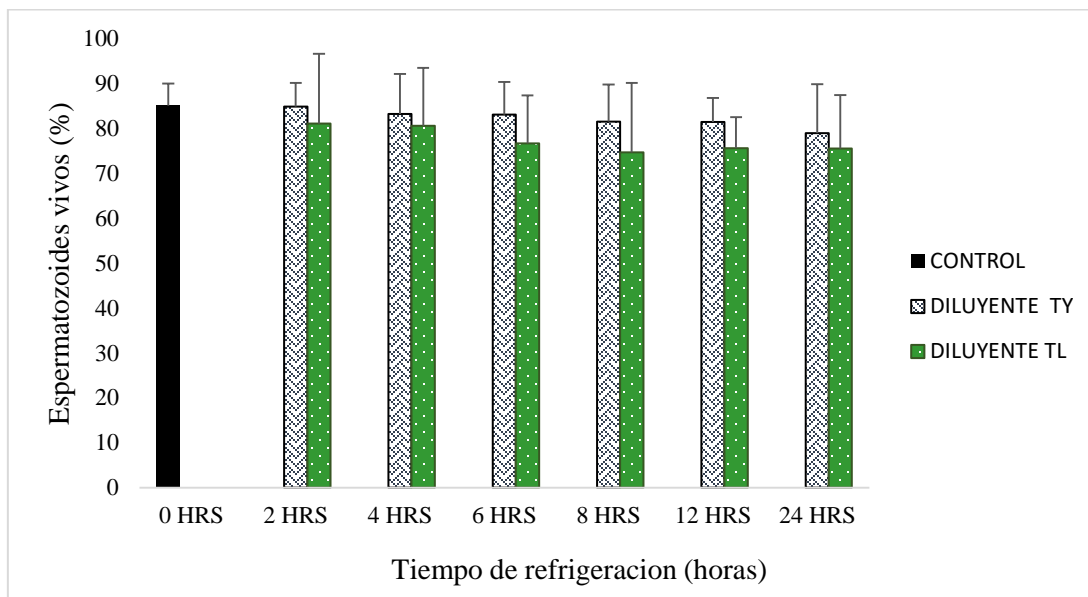
(65.71%) y 8 (50%) horas post-refrigeración; los cuales muestran un descenso gradual entre ellos, sin embargo no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$).

Si bien se observa un descenso gradual de la movilidad progresiva entre ambos diluyentes, no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos ni entre el control. Sin embargo, se observa que a partir de las 8 horas post-refrigeración, los porcentajes de movilidad progresiva son inferiores en el diluyente TL (50%) en comparación con el diluyente TY (70%). Siguiendo con ese mismo patrón hasta las 24 horas, mostrando un 24.3% y un 44.3% de movilidad, respectivamente. No obstante, el comportamiento en ambos diluyentes se muestra de manera similar hacia las 2 horas post-refrigeración al obtener un 80% de movilidad progresiva en ambos. A partir de las 4 y hasta las 24 horas post-refrigeración pueden observarse porcentajes inferiores respecto a este parámetro, cuando es utilizado el diluyente TL en comparación con el diluyente TY.

VIABILIDAD

Con relación al parámetro de viabilidad espermática (expresado en porcentaje de espermatozoides vivos), no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre 2 (84.88%), 4 (82.25%), 6 (83.14%), 8 (81, 57%) y 24 (79%) horas post-refrigeración, con respecto al control (83.15%) con la utilización del diluyente TY. Sin embargo, el porcentaje más bajo de viabilidad espermática se presentó a las 24 horas post-refrigeración con un 79% (Gráfica 2).

El diluyente TL mostró un comportamiento similar, donde se obtuvo una disminución gradual de la viabilidad espermática, no obstante, sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Presentando un 83.13% en el control y 81.13%, 80.63%, 76.71%, 74.71% y 76% para las 2, 4, 6, 8 y 24 horas post-refrigeración respectivamente.

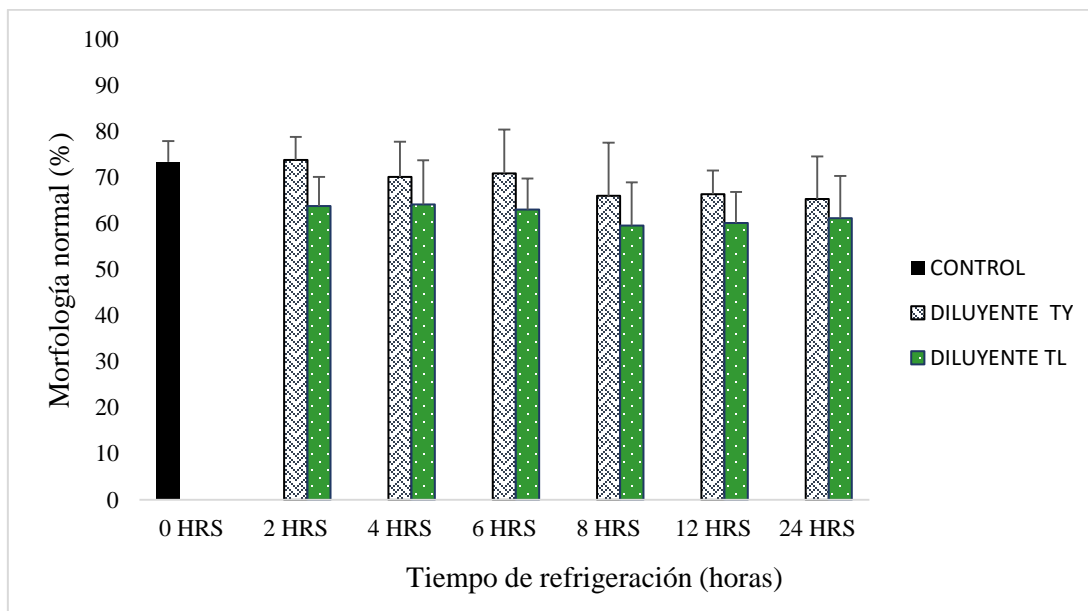


Gráfica 2. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas) a 5°C sobre el parámetro de viabilidad espermática entre diluyentes TY y TL

El comportamiento espermático en ambos diluyentes respecto al tiempo de refrigeración y sobre los porcentajes de viabilidad, mostraron una disminución progresiva conforme transcurre el tiempo de refrigeración; sin embargo, no se presentó diferencia significativa ($P > 0.05$), tanto en el tiempo de conservación como entre los diluyentes respecto al control. Respecto a lo anterior, a pesar de no mostrar diferencia estadística significativa, puede observarse que, a partir de las 2 y hasta las 24 horas post-refrigeración los porcentajes de viabilidad son mayores en el diluyente TY respecto al diluyente TL, mostrando un 79% sobre un 76% respectivamente.

MORFOLOGÍA NORMAL

El diluyente TY no mostró efecto sobre la morfología espermática normal con relación al tiempo ($P > 0.05$) respecto al control. Se obtuvo el porcentaje más bajo (65%) para este parámetro hacia las 24 horas post-refrigeración, en comparación al control (73.38%) y con un 73.75%, 70.12%, 70.86% y 66% a las 2, 4, 6, y 8 horas post-refrigeración respectivamente (Gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de la refrigeración a diferentes tiempos de conservación (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas) a 5°C sobre el parámetro de morfología espermática normal entre diluyentes TY y TL.

De manera similar fue el comportamiento del diluyente TL sobre el porcentaje de morfología normal, el cual presentó una disminución gradual en relación al tiempo de refrigeración. Mostrando un 63.75% hacia las 2 horas post-refrigeración, un 64.13%, 63%, 59.57% y 61.14% para las 4, 6, 8 y 24 respectivamente y un 73.38% para el control. No obstante, a pesar de esta disminución, no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre horas y con respecto al control.

El comportamiento espermático entre ambos diluyentes es similar al parámetro de viabilidad, ya que entre ambos diluyentes no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Sin embargo, es importante resaltar que los porcentajes obtenidos con el diluyente TL son inferiores a los obtenidos con TY. Donde a las 2 horas post-refrigeración con el diluyente TL se obtuvo un porcentaje de 63.75% respecto a un 73.75% alcanzado por el diluyente TY, continuando con un descenso gradual hasta las 24 horas post-refrigeración, obteniendo un 61.14% y 65% con el diluyente TL y TY respectivamente.

7.3 Efecto de la refrigeración sobre la integridad acrosomal

Se contaron 100 espermatozoides por cada laminilla y se clasificaron a los espermatozoides de acuerdo al patrón de fluorescencia observada en la región de la cabeza (Figura 2).

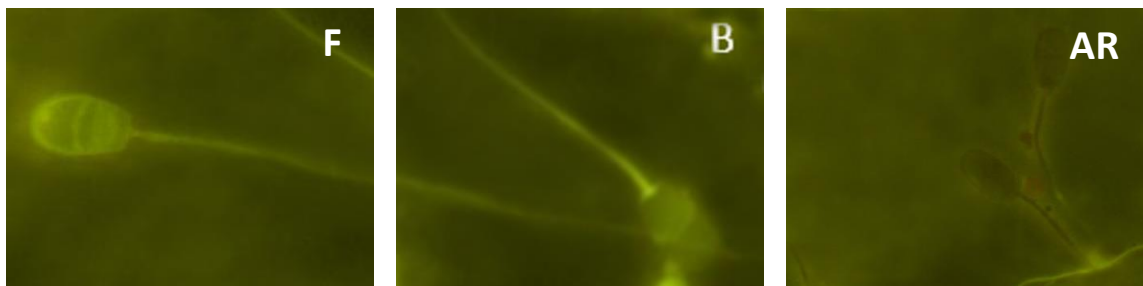


Figura 2. Espermatozoides teñidos con CTC. Patrones de fluorescencia que indican El estado de capacitación del espermatozoide. (F) Espermatozoides no capacitados, (B) Espermatozoides capacitados y (RA) Espermatozoides con reacción acrosomal.

Los resultados de los parámetros básicos de la calidad espermática que presentaron diferencia estadística significativa (movilidad espermática), fueron tomados en consideración para determinar los tiempos en que se realizaría la evaluación del estado fisiológico del espermatozoide, mediante la prueba CTC. Donde, al observar una diferencia significativa ($P < 0.05$) hacia las 8 y 24 horas post-refrigeración respecto al control, estos tiempos fueron tomados en consideración para la evaluación del estado fisiológico de los espermatozoides. Siendo entonces, las 2 horas (tiempo más cercano al control), las 8 y 24 horas post-refrigeración, los tiempos elegidos para la realización de la prueba CTC.

Los resultados sobre la integridad acrosomal hasta 24 horas de almacenamiento en refrigeración con los diluyentes TY y TL se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 7. Estado de capacitación espermática entre diluyentes TY y TL a diferentes tiempos de conservación (2, 8 y 24 horas).

T.R	0 horas	2 horas		8 horas		24 horas	
Diluyente	Tris	TY	TL	TY	TL	TY	TL
Intactos	76 ± 3.63	63.33 ± 5.72	66.50 ± 5.39	61.83 ± 3.87	56.17 ± 6.11 ^b	59.17 ± 2.93	50.50 ± 6.47 ^b
Capacitados	17.5 ± 3.21	21.33 ± 4.93	18.00 ± 3.94	25.67 ± 8.76 ^b	22.33 ± 6.19	25.87 ± 3.67 ^b	26.50 ± 1.87
Reaccionados	6.5 ± 1.87	15.00 ± 5.18 ^b	16.83 ± 4.17 ^b	17.00 ± 5.37 ^b	21.67 ± 3.98 ^b	18.00 ± 5.22 ^b	22.90 ± 6.65 ^b

TR= Tiempo de refrigeración

*= (P < 0.05) se consideró significativo.

ESPERMATOZOIDES NO CAPACITADOS

El porcentaje de espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto, no presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), respecto al diluyente y tiempo de refrigeración. Sin embargo, en ambos diluyentes se observó un descenso gradual hasta las 24 horas.

El efecto del tiempo de refrigeración mediante la utilización del diluyente TL mostró los porcentajes de espermatozoides no capacitados más bajos para las 8 (56.17%) y 24 (50.5%) horas post-refrigeración con respecto al control (76%) y al diluyente TY, el cual a las mismas horas (8 y 24) exhibió porcentajes mayores de 61.83% y 59.17%, respectivamente. No obstante, hacia las 2 primeras horas post- refrigeración el diluyente TL alcanzó un porcentaje superior (66.5%) de espermatozoides no capacitados, pero no significativamente diferente ($P > 0.05$) respecto al diluyente TY con un 63.33% de espermatozoides no capacitados.

ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS

El comparativo del comportamiento espermático entre diluyentes mostró un aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto, respecto al transcurso en el tiempo de refrigeración, sin embargo, no presentaron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre ambos diluyentes, ni entre las diferentes horas post- refrigeración con respecto al diluyente control.

El porcentaje de espermatozoides capacitados mostró un aumento durante el transcurso del tiempo de refrigeración utilizando el diluyente TY con un 21.33%, 25.67% y un 25.87% en 2, 8 y 24 horas, respectivamente, respecto al control (17.5%). Si bien, se observó un incremento en los porcentajes de este parámetro a las 2 y 8 horas post-refrigeración, el porcentaje hacia las 24 horas se mantuvo similar al de las 8 horas. No así en el diluyente TL que mostró el porcentaje más alto de espermatozoides capacitados a las 24 horas post-refrigeración (26.5%) respecto a las 2 (18%) y 8 (22.33%) horas de refrigeración, sin encontrar diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre ambos diluyentes.

ESPERMATOZOIDES CON REACCIÓN ACROSOMAL

El efecto del tiempo de refrigeración espermática con la utilización del diluyente TY mostró un aumento en el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal desde las 2 (15%) horas post-refrigeración y hasta las 8 (17%) y 24 (18%) horas, respecto al control (6.5%), no obstante, no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre el tiempo de refrigeración de ambos diluyentes con respecto al control.

Se observó un comportamiento similar sobre el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal cuando fue utilizado el diluyente TL, donde hacia las 2 horas post-refrigeración exhibió un 16.83% de espermatozoides con reacción acrosomal, el cual fue mayor con respecto al diluyente control (6.5%), pero sin presentar diferencia estadística significativa ($P > 0.05$). En tanto las 8 (21.67%) y 24 (22.90%) horas post-refrigeración mostraron mayores porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal, lo cual es estadísticamente diferente ($P < 0.05$) respecto al control.

Contrastando el comportamiento espermático empleando ambos diluyentes, se observó un incremento progresivo sobre el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal con relación al diluyente y tiempo de refrigeración.

7.4 Efecto de la refrigeración y diluyente sobre los parámetros reproductivos en conejas inseminadas artificialmente.

Para las inseminaciones con semen refrigerado en los diluyentes TY y TL, incluido el control, se realizaron en 35 conejas primíparas.

El objetivo de la segunda etapa del experimento fue determinar el porcentaje de fertilidad y número de gazapos nacidos totales por camada, en conejas inseminadas artificialmente con la utilización de semen refrigerado (2, 8 y 24 horas) con los diluyentes TY y TL y comparar los resultados con el control, semen fresco diluido con Tris. En el cuadro 7, se muestra el

comportamiento reproductivo en conejas inseminadas con semen fresco y semen refrigerado hasta 24 horas, utilizando ambos diluyentes.

Parámetros reproductivos como diagnóstico de gestación positiva, porcentaje de fertilidad, gazapos nacidos totales y tamaño de camada mostró un comportamiento independiente con respecto al tiempo en refrigeración espermática y al tipo de diluyente empleado, excepto con el diluyente TY, que exhibió una disminución en el porcentaje de fertilidad conforme incrementa el tiempo de refrigeración.

Cuadro 8. Efecto de la refrigeración de semen y el tipo de diluyente sobre los parámetros reproductivos en conejas primíparas inseminadas artificialmente.

Inseminación Artificial		Parámetros reproductivos				
Tiempo de Refrigeración (horas)	Diluyente	Diagnóstico de Gestación Positivo (n)	Fertilidad (%)	Gazapos Nacidos Totales (n)	Tamaño Promedio de Camada (n) ± SEM	Peso Promedio de Camada (g) ± SEM
0	Tris	5	100	28	5.6 ± 2.5	0.347 ± 0.142
2	TY	4	80	17	5.6 ± 2.9	0.212 ± 0.103
2	TL	2	40	12	6 ± 2.8	0.322 ± 0.081
8	TY	3	60	25	8.3 ± 3.1	0.427 ± 0.050
8	TL	5	100	25	5 ± 3.7	0.548 ± 0.244
24	TY	2	40	12	4 ± 2.8	0.249 ± 0.142
24	TL	2	40	17	8.5 ± 2.1	0.500 ± 0.084

FERTILIDAD

Los porcentajes de fertilidad para ambos diluyentes, mostraron un comportamiento similar, al obtener 60% con los diluyentes TY y TL respecto al 100% alcanzado en el control.

El comportamiento reproductivo que se presentó con el diluyente TY respecto al porcentaje de fertilidad, refirió una disminución progresiva conforme transcurrió el tiempo de refrigeración, exhibiendo un 80% hacia las 2 horas post-refrigeración, seguido de un 60% y 40% para las 8 y 24 respectivamente. No así en los resultados obtenidos con la utilización del diluyente TL, con los cuales no se exhibió disminución gradual en los porcentajes de fertilidad. Si bien, se mostró una disminución de éste parámetro (40%) hacia las 2 horas post-refrigeración, se contrastó con

el 100% obtenido para las 8 horas de refrigeración, descendiendo nuevamente a las 24 horas, hasta obtener un 40% de fertilidad.

PROLIFICIDAD

Con relación al parámetro de prolificidad, entendido como el promedio de gazapos nacidos por camada, se observó que con el empleo del diluyente TL se obtuvo un número mayor de gazapos nacidos totales (6.5 gazapos), respecto a los 5.5 gazapos nacidos totales utilizando el diluyente TY, no representando diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).

Puede observarse comparativamente el número de gazapos nacidos totales entre ambos diluyentes hacia las 2, 8 y hasta 24 horas post-refrigeración (Cuadro 6). Se muestra que el número de gazapos nacidos totales obtenidos mediante la utilización de los diluyentes TY y TL son menores respecto al control (28 gazapos).

Si bien el número de gazapos nacidos es inferior para ambos diluyentes, no presenta una disminución gradual. Siendo para el diluyente TY, 17 gazapos nacidos con la utilización de semen refrigerado hacia las 2 horas, para las 8 y 24 post-refrigeración, en el presente estudio, se obtuvieron 25 y 12 gazapos nacidos respectivamente.

El parámetro de fertilidad, número de gazapos nacidos y tamaño de camada, obtenido con la utilización del diluyente TL se comportó de manera similar al diluyente TY, ya que no mostró disminución en ninguno de estos parámetros conforme transcurrió el tiempo de refrigeración. Donde, hacia las 8 horas post-refrigeración se obtuvo el mayor número de gazapos nacidos (25 gazapos), pero con un tamaño de camada de 5 ± 3.7 similar al control (5.6 ± 2.5) y frente a 12 y 17 gazapos que corresponden a las 2 y 24 horas respectivamente. No obstante, estos últimos tiempos presentan un tamaño de camada mayor con un 6 ± 2.8 y 8.5 ± 2.1 respectivamente y también frente al control.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN

A principios de los años 70's, se mostró la posibilidad de la utilización de la inseminación artificial para la producción de carne de conejo, pero no fue hasta finales de los años 80's, cuando se generalizó su uso en las granjas, ligado fundamentalmente a la posibilidad de la utilización de semen procedente de machos seleccionados. Esta biotecnología, ha conseguido aumentar el rendimiento reproductivo de una coneja, al estar más controlada (celo, ovulación, gestación y parto) y a su vez disminuir los costos de mantenimiento de un número mayor de machos, ya que con la IA se necesitan menos machos por número de hembras a inseminar. Siendo la IA, una herramienta valiosa para diseminar material genético de alta calidad, permitiendo expresarse en una población ganadera competitiva. No obstante, la conservación de semen refrigerado para su utilización en IA, produce una merma en su capacidad fertilizante, en parte, debido a la respuesta de los espermatozoides de conejo a la conservación en refrigeración. Está considerado que la conservación entre los 5°C y 15°C, el espermatozoide de conejo sufre cambios funcionales, que incluyen, entre otros, una disminución en la movilidad y viabilidad, junto con alteraciones en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal (El-Kelawy *et al.*, 2012; Roca *et al.*, 2000). Esta pérdida de la capacidad fertilizante producida durante la conservación mediante refrigeración, podría estar relacionada con la composición de la membrana plasmática del espermatozoide de conejo, el cual es rico en ácidos grasos polinsaturados n-6, principalmente C22:5, lo cual aumenta la susceptibilidad a sufrir daño peroxidativo provocado por la liberación de radicales libres que ocurre durante el proceso de refrigeración (Zaniboni *et al.*, 2004). Es por ello, que se realizan esfuerzos para mejorar la eficiencia de los diluyentes empleados para la conservación seminal en refrigeración, de modo que permitan incrementar la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides durante su almacenamiento a temperaturas cercanas a 0°C (Maertens y Luzi 1995; Alvarino, 2000; Roca *et al.*, 2000). Actualmente la refrigeración es el método de conservación espermática más utilizado, fundamentalmente por no presentar serias pérdidas en su calidad, lo cual se refleja en los parámetros de movilidad, viabilidad y capacidad fertilizante, especialmente cuando se utilizan diluyentes con tampón Tris en su composición (Sariozkan *et al.*, 2013). En contraste, en los conejos se restringe el método de crioconservación o almacenamiento por congelación a

trabajos experimentales, ya que los resultados de pruebas de fertilidad *in vivo*, hasta ahora, no permiten su utilización en granjas comerciales con suficientes garantías de éxito (Ferriani., 2007; Iaffaldano y Rosato 2012). Lo anterior, es atribuido en gran medida, al incremento en el proceso de capacitación y reacción acrosomal sufrida de manera prematura por los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación. Tanto el proceso de capacitación como la reacción acrosomal, deben ocurrir dentro del tracto genital femenino y son fundamentales para realizar la fertilización (Iaffaldano *et al.*, 2014; Si *et al.*, 2006; Benson *et al.*, 2012).

En este estudio se analizó el efecto de dos diluyentes sobre los indicadores de calidad espermática del conejo Nueva Zelanda Blanco durante 24 horas de almacenamiento a 5°C, así como en los parámetros de fertilidad y prolificidad en conejas inseminadas artificialmente. Si bien, se encontró una pérdida progresiva en la calidad espermática durante el tiempo de almacenamiento, los resultados obtenidos en el presente experimento, indicaron que el diluyente TY fue el más apropiado para conservar las características cualitativas de los espermatozoides del conejo, durante 24 horas de almacenamiento en refrigeración. Mientras que, en relación a los parámetros reproductivos obtenidos en las conejas inseminadas, los resultados muestran una independencia respecto al tipo de diluyente utilizado y al tiempo de refrigeración al cual fue mantenido el semen. Al respecto, las directrices del Grupo Internacional de Reproducción del conejo, señalan, que el intervalo óptimo de temperatura para el almacenamiento de semen de conejo, hasta por 48 horas es de 15 a 18° C. En ese sentido, estudios previos se han llevado a cabo para evaluar la viabilidad del semen de conejo almacenado en refrigeración (Roca *et al.*, 2000; Di Lorio *et al.*, 2014); Rosato y Iaffaldano (2011) obtuvieron resultados superiores en supervivencia y funcionalidad espermática, con una temperatura de refrigeración de 5°C en comparación con 15°C. La temperatura de elección para el mantenimiento y prolongación de la vida útil de los espermatozoides en el presente trabajo fue de 5°C, la cual fue seleccionada en base a la factibilidad de controlar temperaturas cercanas a 0°C; además, y desde un punto de vista más práctico, acercarnos lo más posible a las condiciones reales requeridas para el traslado del semen hacia los sitios de utilización. Por ello y con base a la demostración de la efectividad de la yema de huevo, utilizada desde hace 70 años como crioprotector de origen biológico (Talib *et al.*, 2013; Garde *et al.*, 2008; Ebenesperger *et al.*, 2015), así como de la leche descremada

(Tsunoda *et al.*, 2015), se planteó evaluar la efectividad protectora de dichos componentes sobre los parámetros de calidad espermática, como son: movilidad, viabilidad, morfología normal e integridad del acrosoma en espermatozoides de conejo almacenados en refrigeración. Si bien, se ha descrito en otras especies la utilización de la yema de huevo y de la leche descremada para prolongar la vida útil de los espermatozoides para este tipo de almacenamiento (Dorado *et al.*, 2011; Talib *et al.*, 2013; Allai *et al.*, 2015), en conejos, son escasos los estudios respecto a la utilización de estos componentes para evaluar la funcionalidad espermática del semen refrigerado, además de no contemplar un seguimiento reproductivo en las hembras inseminadas con esos mismos eyaculados, por lo que es importante realizar la evaluación de los parámetros reproductivos en conejas. De igual manera se consideró la importancia de aportar datos de manera simultánea y contrastar entre ambos diluyentes, el comportamiento de la calidad espermática, respecto al efecto protector brindado durante el proceso de refrigeración. Dado que la eficacia del diluyente es uno de los principales factores que influyen en los espermatozoides para conservar su capacidad fertilizante durante un tiempo relativamente prolongado (Barbas y Mascarenhas 2009; Salamon y Maxwell 2000), puesto que provee básicamente, una fuente adecuada de nutrientes, un ambiente que protege a los espermatozoides contra la disminución de temperatura, así como sustancias amortiguadoras que los resguarden contra cambios extremos de pH. Así, los diluyentes empleados en este estudio incluyeron de manera concreta componentes tales como Tris base y ácido cítrico (amortiguador de pH), glucosa (fuente energética), yema de huevo y leche descremada (protector contra bajas temperaturas), con el fin de incrementar durante el mayor tiempo posible, la capacidad fertilizante de los espermatozoides de conejo conservados en refrigeración.

La movilidad, viabilidad, morfología normal e integridad de las membranas plasmática y acrosomal, son parámetros de la función espermática, directamente relacionados con la capacidad fertilizante y que se modifican con la refrigeración a largo plazo. Su evaluación refleja tanto estructura, funcionalidad y competencia espermática, así como aspectos esenciales de su metabolismo, por lo que se utilizan como referencia en este estudio; en el cual se ha observado que la tolerancia de los espermatozoides a la refrigeración durante 24 horas en términos de supervivencia y funcionalidad entre ambos diluyentes, indica un comportamiento diferencial

expresado en la interacción con los espermatozoides. Así mismo, se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura (Sánchez *et al.*, 2006). Esta estructura presenta múltiples dominios que presentan una composición y organización característica, lo que brinda propiedades físicas y funciones distintas (Nicolson, 2014; Edidin, 2003; Palsdottir y Hunte 2004). Para Parks y Graham (1992), la conservación de dichos compartimentos o dominios resulta crítica para las funciones del espermatozoide, ya que cada uno asume un papel muy específico en la fertilización.

Estos compartimentos son principalmente: la red mitocondrioflagelar (importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide), la cabeza (de cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica, y el núcleo, necesario para el almacenamiento estable del ADN), y el segmento ecuatorial (imprescindible para la unión espermatozoide-ovocito). Subsecuentemente, los principales daños celulares inducidos por la refrigeración, incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la refrigeración), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (Martins, 2005).

La movilidad es considerada el criterio más importante en la evaluación de la fertilidad del macho, el objeto de su estimación es determinar la proporción de espermatozoides móviles y la proporción de los que se mueven progresivamente. En este trabajo, se registró un descenso gradual de la movilidad progresiva entre ambos diluyentes, pero no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos, ni entre el control. Al respecto, en este trabajo, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir de las 12 horas y hasta las 24 horas post-refrigeración tanto para el diluyente TL (24.3%) y TY (44.3%), respecto al control y a las 2, 4, 6 y 8 de almacenamiento. Estudios previos, han demostrado el efecto protector proporcionado por la yema de huevo, sobre la movilidad espermática en diversas especies. Crespilho *et al* (2014), reportaron un 43.4% de movilidad progresiva en semen bovino, refrigerado a 5°C, utilizando un medio de Tris-yema de huevo-fructosa. Utilizando la misma temperatura (5°C) y componentes similares (Tris-yema de huevo). Mientras que Alli *et al* (2015) obtuvo un 53.91%

y 45.8% de movilidad progresiva en espermatozoides de ovino, hacia las 8 y 24 horas post-refrigeración respectivamente. Este mismo autor reportó un 48.1% (8 horas) y un 40.0% (24 horas) de movilidad progresiva utilizando leche descremada, comparado a lo reportado en este trabajo, donde se obtuvo un 50% y 24.29% para las 8 y 24 horas post-refrigeración respectivamente. En contraste, Sánchez *et al* (2006) registraron un 93.0% de movilidad, hacia las 24 de refrigeración a 4°C, para semen canino. La movilidad del espermatozoide es un factor crítico en el proceso de interacción de los gametos; una disminución en la velocidad y en la proporción de células móviles progresivas, refleja lesiones celulares que pueden reducir las posibilidades de fecundación (Martins, 2005 y Malmgren, 1997).

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones que el propio proceso induce en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente hasta alcanzar los 0° C y cuya señal más evidente es la pérdida de movilidad tras el calentamiento; observándose movimientos circulares de los espermatozoides y pérdida precoz de la movilidad (Quinn y White, 1966). Existen evidencias de que el choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas, resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis *et al.*, 1993). A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de la membrana están en un estado más o menos fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles. Se sabe que algunos lípidos de la membrana del espermatozoide, los lípidos no-bicapa, asumen una disposición hexagonal, estando implicados en la formación de un anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana. Así que, al disminuir la temperatura de la membrana por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen, estos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado de gel, comenzando a agregarse. Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas; fenómeno que afecta las funciones de las proteínas, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Martins, 2005).

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío se reportaron en 1939 por los trabajos de fertilidad en toros, realizados por Phillips y Lardy (Pillet *et al.*, 2011), y ha demostrado ser muy eficaz para el mantenimiento de la fertilidad del semen, tanto especies domésticas como exóticas. Su composición, es una mezcla compleja, conformada principalmente por 68% de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 16% lipoproteínas de alta densidad (LHL), 10% de levetelinas, 4% de fosfivitinas (García, 2005). Laca *et al* (2015), menciona que la yema de huevo es una emulsión que contiene aproximadamente 52% de materia seca, del cual aproximadamente el 65% es grasa, el 31% proteína y los restantes 4% son carbohidratos, vitaminas y minerales. Menciona además, que es una fuente principal de ingredientes activos, que pueden ser fácilmente fraccionados por centrifugación para la separación de sus componentes en plasma (sobrenadante) y gránulos (pellet). Siendo el plasma la fase acuosa en la que las partículas de la yema están en suspensión, compuesta por 85% de lipoproteínas de baja densidad y 15% glicoproteínas globulares, sobre todo a, b y g-livetinas. Las LDL son grandes partículas esféricas de 17-60 nm de diámetro con un núcleo de triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeadas por un monofilm de apoproteínas (llamados lipovitelinias) y fosfolípidos.

En 1974, Pace y Graham purificaron la yema de huevo y observaron que la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL), representaba la propiedad protectora (Hu *et al.*, 2011). De hecho, estas moléculas y los mecanismos exactos involucrados que participan durante la protección de los espermatozoides durante este proceso, aún no están claros (Hu *et al.*, 2006; Moussa *et al.*, 2002). Es por ello que se plantean varias hipótesis para explicar las capacidades de protección de las LDLs. En primer lugar, se propone que las LDL se adhieren a la membrana plasmática de los espermatozoides, formando una película protectora en la superficie, proporcionándoles protección mediante la estabilización de su membrana durante la conservación. En segundo lugar, se propone que las LDLs podrían fusionarse con la membrana plasmática y reemplazar a los fosfolípidos de la membrana que se pierden o son dañados, aumentando así la tolerancia de los espermatozoides al choque por frío. En tercer lugar, se propone que las LDLs compiten con los péptidos catiónicos perjudiciales del plasma seminal,

en la unión a la membrana de los espermatozoides (Bergeron *et al.*, 2004; García, 2005). Por lo anterior, se considera que la yema de huevo actúa como un crioprotector externo o no penetrante.

La sensibilidad al choque por frío varía entre las especies. Es así que algunos componentes, como los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática y la relación entre ellos, es importante en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque frío; como también la relación entre colesterol/fosfolípidos. Habiéndose observado que una relación superior a 0.5, confiere una mayor resistencia al choque térmico (García, 2004). Por lo que las variaciones del efecto protector de la yema de huevo entre especies podría deberse a la diferencia cuantitativa de los componentes de su membrana, así como a la concentración de la yema de huevo requerida para cada especie. Comúnmente la yema de huevo es utilizada en los diluyentes seminales, en concentraciones que van del 3 al 25% (v/v) (England, 1993).

Como se mencionó anteriormente, la yema de huevo se ha utilizado de forma rutinaria como componente en el diluyente, para la conservación exitosa de semen refrigerado de especies tanto domésticas como silvestres. No obstante, varios autores (Pillet *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Röpke *et al.*, 2011) han señalado los inconvenientes de su utilización. La contaminación es una de ellas; siendo un componente de origen animal, representa un riesgo potencial de contaminación para los espermatozoides, comprometiendo su viabilidad (Pillet *et al.*, 2012). Por ello, la utilización de diluyentes comerciales ofrece una alternativa para reducir la contaminación en el eyaculado, conservando su capacidad fertilizante. Se ha reportado un 40% de movilidad (Rosato *et al.*, 2006) en espermatozoides de conejo refrigerados utilizando un diluyente comercial (Lepus), hacia las 24 horas de refrigeración, cuyo parámetro es similar al obtenido en el presente estudio con la utilización de la yema de huevo (44.3%). Por otra parte, Carluccio *et al.* (2006), evaluó la eficacia de dos diluyentes comerciales: Lepus, M III e INRA 96, elaborado por ese mismo Instituto para el mantenimiento de espermatozoides de conejo refrigerado a 4°C hasta 34 horas. Los resultados en movilidad reportados para cada uno de los diluyentes hacia las 25 horas post-refrigeración muestran lo siguiente: el diluyente Lepus (4.8 %), mostró una motilidad muy por debajo de los resultados obtenidos en el presente estudio; sin

embargo el diluyente MIII (29.5%) se situó por arriba de lo obtenido por el diluyente TL, pero muy por debajo de TY; y por último el diluyente INRA mostró una superioridad con un 87.1% respecto a los diluyentes TY y TL. (Se tomó en cuenta las 25 horas post-refrigeración para comparar con nuestros resultados, ya que es el tiempo que más se acerca al último tiempo evaluado en este estudio, que fue de 24 horas post-refrigeración). Así mismo, Rosato y Iaffaldano estudiaron el efecto de tres diluyentes; dos de ellos: Lepus y Merk III (también conocido como MII), evaluados con anterioridad por Carluccio *et al* (2006), y el diluyente Cortalap (diseñado para su utilización en conejos), sobre el mantenimiento de la movilidad progresiva e integridad de la membrana de espermatozoides refrigerados (a 5°C) de conejo, durante 72 horas. Los resultados obtenidos por estos autores para cada uno de los diluyentes, en relación a la movilidad progresiva, indican inferioridad de este parámetro respecto a los obtenidos con el diluyente TY, pero superioridad respecto al diluyente TL logrados en este estudio. No obstante, los resultados para Lepus, Merk III y Cortalap en relación a la integridad de membrana se muestran inferiores tanto para TY como para TL. Los resultados anteriores indican contradicción, por lo descrito por Pillet *et al.*, 2012, donde se alude que la yema de huevo al ser de origen animal, representa un riesgo potencial de contaminación para los espermatozoides, comprometiendo su viabilidad. En el presente estudio, a pesar de la utilización de este componente de origen animal, se obtuvo una mejor respuesta de protección al espermatozoide en relación con los diluyentes comerciales, los cuales son sometidos a un estricto control de calidad respecto a su inocuidad como punto importante para la industrialización.

Otro de los parámetros evaluados con mayor frecuencia es la integridad de la membrana plasmática, ya que es una estructura esencial para algunas funciones metabólicas tales como la capacitación, reacción del acrosoma, interacción con la zona pelúcida y fusión de la membrana del espermatozoide con la del ovocito. La pérdida de su integridad es considerada como incompatible con la capacidad del espermatozoide de fecundar un ovocito *in vivo* (Salinas *et al.*, 2014; Rijsselaere *et al.*, 2004; Mourvaki *et al.*, 2010), siendo sumamente útil su determinación para predecir su capacidad fertilizante *in vitro*. Los valores reportados en este estudio, con relación a la integridad de la membrana plasmática, para ambos diluyentes respecto al tiempo

de refrigeración, muestra una disminución progresiva conforme transcurre el tiempo de conservación; sin embargo no se presentó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$), tanto en el tiempo de conservación como entre los diluyentes, respecto al control. No obstante, se observó que a partir de las 2 y hasta las 24 horas post-refrigeración, los porcentajes de viabilidad fueron mayores en el diluyente TY (79%) respecto al diluyente TL (76%). Resultados similares fueron reportados por Allai *et al* (2015), quienes determinaron la efectividad de la yema de huevo y leche descremada sobre la integridad de la membrana de los espermatozoides refrigerados (5°C) de ovino durante 48 horas. Los resultados obtenidos con la utilización de la yema de huevo fueron de un 87.56% y 79.5% hacia las 8 y 24 horas post-refrigeración, en comparación con nuestros resultados (81.57% y 79%) para los mismos tiempos de refrigeración; mientras que para la leche descremada, estos autores reportan un 86.44% y 82.75% hacia las 8 y 24 horas de refrigeración contra un 74.71% (8 horas) y 76% (24 horas) de nuestro estudio. Respecto a la utilización de leche descremada, Sánchez *et al* (2006), evaluaron la efectividad de la yema de huevo y leche descremada; pero en semen refrigerado de canino, a 4°C durante 96 horas, sobre la viabilidad espermática. Ellos reportaron un 75.4% y 66.8% de integridad de la membrana, hacia las 24 horas post- refrigeración, con la utilización de yema de huevo y leche descremada respectivamente. Por otra parte, Rosato *et al* (2006), obtuvieron un 65% de viabilidad en espermatozoides refrigerados de conejo, utilizando un diluyente comercial (*Lepus*) hacia las 24 horas de refrigeración. Mostrando un resultado inferior, en comparación con los dos diluyentes utilizados en este estudio. Respecto a lo anterior, se observó diferencia en la eficacia de la yema de huevo y la leche descremada sobre la integridad de la membrana espermática entre especies, y en donde este último componente muestra una eficacia menor, así mismo es interesante el resultado obtenido con el diluyente comercial, cuyos parámetros de viabilidad fueron aún más bajos que los obtenidos con la utilización de leche descremada. Este mismo comportamiento, en relación a la eficacia de los diluyentes, también se observa para el parámetro de morfología normal espermática. Los resultados obtenidos en este estudio con el diluyente TL son inferiores a los obtenidos con el diluyente TY. Se observó que hacia las 2 horas post-refrigeración con el primer diluyente, se logró un porcentaje del 63.75% respecto a un 73.75% alcanzado por el segundo diluyente, continuando con un descenso gradual hasta las

24 horas post-refrigeración, obteniendo un 61.14% y 65% con el diluyente TL y TY respectivamente.

Pese a la amplia utilización de la leche descremada, de manera convencional, como componente en la conservación de semen (Salamon y Maxwell, 2000), actualmente el mecanismo de acción por el cual este componente ejerce su efecto protector, no se ha esclarecido en su totalidad, aunque se han propuesto varios mecanismos (Bergeron y Manjunath, 2006). Tsunoda *et al.*, (2015) y Aurich (2008), refieren que los componentes activos a los que es atribuido su efecto protector, son las micelas de caseína, que interactúan con las proteínas del plasma seminal y lo protegen contra la eliminación de los fosfolípidos y el colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides; manteniendo al mismo tiempo, la movilidad y viabilidad del espermatozoide (Allai, 2015). En bovinos, se ha demostrado que las micelas de caseína interactúan y secuestran las proteínas del plasma seminal, las cuales inducen el flujo en la salida del colesterol y los fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide, conduciendo a su desestabilización (Krishnakumar *et al.*, 2011). Las caseínas constituyen un grupo de fosfoproteínas, que tiene como característica distintiva su función, principalmente nutritiva. La caseína es la proteína más abundante de la leche y representa aproximadamente entre el 77% y 82% de las proteínas totales. La caseína se encuentra en la leche en estado coloidal, en forma de micelas (proteína densa en estado granular), que son agrupaciones de numerosas unidades de caseína (Gómez, 2007), las cuales están constituidas por 4 proteínas, denominadas α_1 , α_2 , β y κ -caseínas (Bravo, 2012). La fracción de β -caseína constituye el 45% de las caseínas, está compuesta de 209 aminoácidos y es la más hidrofóbica de todas las caseínas, a su vez, forma junto con la α -caseína, el núcleo de la micela. La fracción de la κ -caseína está formada por 169 aminoácidos, representa entre el 12 y el 15% del total de la caseína de la leche, se encuentra en la superficie de la micela y junto con la β -caseína y se encarga de proporcionarle estabilidad a su estructura (Zepeda, 2013).

Retomando las diferencias observadas, en cuanto la eficacia de la yema de huevo sobre la leche descremada, en base a la integridad de la membrana espermática entre especies y sobre los parámetros de movilidad, integridad de la membrana y morfología determinados en este estudio,

se pueden plantear algunas hipótesis para explicar el desempeño del diluyente TL: i) en general, las caseínas tienen bajos niveles de estructura secundaria y terciaria, lo que les confiere gran flexibilidad y una estructura fácilmente desnaturizable, por efecto de la temperatura y susceptibilidad a la acción de las enzimas (Bravo, 2012) y ii). Dado que la temperatura es un factor que afecta la estabilidad del sistema micelar de la caseína, a los 4°C, la β -caseína comienza a disociarse de la micela (Gómez, 2007). Así mismo, la multitud de modelos diferentes que han sido propuestos sobre la estructura de la micela de caseína, constituyen una evidencia clara de la ausencia de conocimientos sólidos sobre el mecanismo protector de la leche descremada empleándola a temperaturas de refrigeración (Ferrandini *et al.*, 2006). En consecuencia, queda reducida la posibilidad de esclarecer con mayor exactitud el mecanismo de acción de las micelas de caseína, así como su relación con la supervivencia espermática.

Los resultados aquí presentados corroboran la importancia que tiene la presencia de la yema de huevo en el diluyente de refrigeración para el semen de conejo, dados sus beneficios en la preservación de la movilidad, morfología normal y en la estabilización de la membrana del espermatozoide. Así mismo, se sugiere que este protector biológico ofrece mayor eficacia para contrarrestar el daño ocasionado por el proceso de refrigeración. No obstante, el efecto protector de la leche descremada respecto a estos últimos dos parámetros, no fue significativamente diferente, pero sí lo fue para la movilidad.

Otro de los indicadores de calidad espermática determinado en este estudio fue la integridad de la membrana acrosomal del espermatozoide. Es importante mencionar que la reducción en tiempos de evaluación para este parámetro (2, 8 y 24 horas post-refrigeración), respecto a las contempladas en la evaluación de movilidad, integridad de la membrana plasmática y morfología normal (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas post-refrigeración) fueron reducidos, ya que se planteó incluir solo aquellos tiempos en los que fueron presentaran diferencias significativas entre ellos, con relación a cada uno de los parámetros de calidad espermática anteriormente evaluados. La valoración de la integridad acrosómica, junto con la valoración de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, ha sido uno de los parámetros seminales más estudiados, debido a que juega un papel clave en la fertilización (Cabrera *et al.*, 2012), ya que

sólo los espermatozoides que presentan un acrosoma íntegro, podrán realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito y, como consecuencia, podrán fusionarse con éste, para formar un embrión (Januskauskas *et al.*, 2000). No obstante, cualquier daño en el acrosoma, provoca que se liberen enzimas como la acrosina y la hialuronidasa (que son de las más importantes, que el acrosoma alberga en su interior), impidiendo que ocurra la fertilización, de forma que, si el porcentaje de espermatozoides que presentan éstas alteraciones es elevado, puede provocar un descenso de la fertilidad (Ferrian, 2007). Este estudio reporta que para las 8 y 24 horas post-refrigeración, los espermatozoides conservados con el diluyente TY, presentaron mayores porcentajes de integridad en su acrosoma (espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto) mostrando un 61.83% y 59.17% respectivamente en comparación con un 56.17% (8 horas) y 50.5% (24 horas) correspondiente al diluyente TL. No obstante, hacia las 2 primeras horas post-refrigeración el comportamiento espermático presentado con el diluyente TL alcanzó un porcentaje superior (66.5%), pero no significativamente diferente ($P > 0.05$) respecto al diluyente TY con un 63.33% de espermatozoides no capacitados. Estos resultados se encuentran muy por encima de los obtenidos por Cresphilo *et al* (2014), quienes reportaron 4.0% de acrosomas intactos en espermatozoides refrigerados de bovino (a 5°C), hacia las 24 horas, utilizando un diluyente a base de Tris-yema de huevo-fructosa. En contraste, Florez *et al* (2014), reportó que el diluyente a base de Tris base y leche descrema, mostró mayor eficacia en relación a la integridad acrosomal (96.5%), en espermatozoides de caballo, hacia las 12 horas post-refrigeración, resultados incluso mayores a nuestro control (76%). Durante el proceso de conservación, los espermatozoides sufren muchas tensiones derivadas del descenso en la temperatura. Sin embargo, existen diferencias entre especies en su capacidad de resistir al proceso, en parte, es debido a las diferencias en la composición de su membrana plasmática. (Mocé, 2009).

En este estudio, el porcentaje de espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto al diluyente y tiempo de refrigeración. Sin embargo, se observa un descenso gradual sobre este parámetro durante el transcurso del tiempo de refrigeración y hasta las 24 horas tanto para el diluyente TY y TL. Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen, es el conjunto de

alteraciones que se presentan en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico” o “choque de frío”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de la viabilidad, que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0° C y cuya señal más evidente es la pérdida precoz de la movilidad, derivada de la reducción en la actividad respiratoria del espermatozoide, afectando negativamente la actividad glucolítica y los niveles de ATP. Además de alteraciones morfológicas, como ruptura de la membrana plasmática, lesiones en las mitocondrias y degeneración acrosomal (Rojas, 2014). La refrigeración, anticipa las modificaciones de la membrana plasmática, que normalmente se producen durante la capacitación, observándose un incremento en la tendencia de las células a mostrar patrones típicos de los estadios de capacitación, lo que indica que la refrigeración induce un estadio equivalente a la capacitación; fenómeno también observado a nivel de la fluidez de la membrana y en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del Ca^{2+} . Además, el aumento intracelular de este ion durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre la membrana plasmática y acrosomal externa de forma prematura. Por otra parte, el ADN sufre degeneración. Las alteraciones bioquímicas del espermatozoide están causadas sobre todo por la pérdida de la selectividad de la membrana y por la pérdida de enzimas y fosfolípidos (Martins, 2005).

El conjunto de alteraciones estructurales sobre los espermatozoides, se encuentra directamente relacionado con el proceso de fertilización. No obstante, este proceso biológico, es uno de los más complejos, el cual involucra la interacción entre células altamente especializadas, como el espermatozoide y el ovocito, que proporcionan un ejemplo único de numerosos procesos celulares, que convierte dos células totalmente diferenciadas en un cigoto totipotente (Cánovas y Coy, 2008). Por lo cual, la eficiencia de la IA depende de parámetros y/ o factores relativos al macho y a la hembra (Brun *et al.*, 2016). Entre algunos factores que intervienen de manera directa, y en relación con la hembra, se encuentran: el estado o condición fisiológica y edad de vida reproductiva (Castellini y Lattaioli, 1999). Además de factores relacionados directamente con la técnica de IA, como son: la técnica de inducción de celo e inducción a la ovulación (García y Rodríguez, 2002) y número de espermatozoides por dosis (Roca *et al.*, 2000). En el presente estudio las hembras inseminadas artificialmente estuvieron bajo el mismo método de

inducción de celo y ovulación, además recibieron el mismo número de espermatozoides por dosis inseminante, que fue de 30×10^6 /ml. En conejas, se ha estudiado la reducción en la cantidad de espermatozoides, conforme a su trayectoria por el tracto reproductivo de la hembra. Castellini y Lattaioli (1999), determinaron la relación entre el número de espermatozoides móviles inseminados en las conejas, sobre la tasa de fertilidad y tamaño de camada al nacimiento, registrando el valor máximo de gazapos al nacimiento de 10.97, con una concentración de 4 millones de espermatozoides móviles, por dosis en semen fresco. Vicente *et al.*, en 2008, inseminaron con 6 millones de espermatozoides totales por dosis, obteniendo 9.7 gazapos por camada. Rodríguez *et al.*, 1983, menciona que cuando la dosis de inseminación de 0.5 ml tiene una concentración de 30×10^6 espermatozoides, se sobrepasan ampliamente lo mínimos exigidos, por lo que una dosis de $10-20 \times 10^6$ espermatozoides por dosis, asegura razonablemente la presencia de $1-6 \times 10^6$ espermatozoides móviles, cubriendo las exigencias mínimas para la fertilización (Adam, 1972). Lo mencionado por estos dos autores, fue considerado para la elección de la concentración de espermatozoides por dosis empleada en este estudio; además de considerar que, si bien, la trayectoria realizada por el espermatozoide desde el sitio de deposición seminal (cervical) hasta el lugar de fertilización, es menor a la trayectoria recorrida cuando se realiza por monta natural (vagina), las alteraciones sufridas por el espermatozoide durante el proceso de refrigeración, debe compensarse con el aumento en el número de espermatozoides por dosis, tal como lo mencionan Salamon y Maxwell, 2000.

No obstante, Farrell *et al.*, 1993, llegaron a la conclusión de que existen condiciones que influyen sobre el número mínimo de espermatozoides necesarios para alcanzar los porcentajes de concepción máximos en conejos, como el diluyente y el tiempo de almacenamiento de los espermatozoides. Holt y Fazeli, 2010, mencionan que el efecto lavado que provocan los diluyentes, puede modificar la membrana plasmática de los espermatozoides, además de la manipulación espermática que se produce durante la elaboración de las dosis seminales, la cual da lugar a procesos de capacitación que normalmente ocurren dentro el tracto reproductivo de la hembra. En conejos, el efecto perjudicial de la dilución puede ser correlacionado con la dispersión extrema de plasma seminal, el cual tiene un papel relevante en la evaluación de la motilidad (Gottardi, 1993), ya que el plasma seminal, lejos de ser un medio de transporte de la

célula espermática en su camino hacia el ovocito, juega un papel fundamental en el proceso reproductivo, garantizando la viabilidad del espermatozoide, proporcionando nutrientes, protección, factores reguladores de la capacitación y del reconocimiento y unión con el ovocito (Buxadé y Sánchez, 2000). Entre los reguladores de la capacitación, se encuentran los gránulos de la secreción prostática, producidos y secretados por la próstata del conejo (Mourvaki *et al.*, 2010), los cuales, son capaces de inhibir la capacitación espermática, lo que retrasa la reacción del acrosoma, y además, promueven la movilidad de los espermatozoides, durante la primeras horas después del apareamiento. Ambos efectos son requisitos fundamentales para el éxito de la fertilización del ovocito, en animales con ovulación inducida, como es el caso del conejo (Cardinali *et al.*, 2010)

Al igual que en la movilidad, el plasma seminal tiene un efecto positivo en el mantenimiento de la viabilidad durante su almacenamiento *in vitro* (Castellini *et al.*, 2000), este efecto se ha asociado con propiedades antioxidantes. Akman, 2008, concuerda con lo anterior, ya que demostró que el plasma seminal ejerce un efecto protector, especialmente durante las primeras 24 horas del período de almacenamiento, en las membranas plasmáticas de los espermatozoides de conejo almacenados 4 ° C.

El-Kelawy *et al.*, 2012, evaluaron la movilidad, viabilidad y capacidad fertilizante de espermatozoides de conejo refrigerados a 5°C durante 24 horas. El semen fue diluido con citrato-fructosa-yema de huevo, reportando un porcentaje de fertilidad del 70% y un tamaño de camada de 5.95 ± 0.39 gazapos hacia las 24 horas de almacenamiento. Estos mismos parámetros reproductivos fueron evaluados por Roca *et al.*, 2000, pero con semen refrigerado a 15°C hasta 96 horas, con un diluyente a base de Tris-ácido cítrico-glucosa y con hembras en diferentes estados fisiológicos (nulípara, primípara y lactante), reportando un porcentaje de fertilidad para hembras nulíparas de 79.0 ± 3.2 y un tamaño de camada de 7.89 ± 0.29 . Por otra parte López y Alvariño, 1998, evaluaron el efecto de un diluyente comercial MA24 (Laboratorios Ovejero, León, España), sobre los parámetros de fertilidad y prolificidad en hembras lactantes inseminadas con semen refrigerado a 18°C hasta por 96 horas, consiguiendo para las 24 horas un porcentaje de fertilidad del 83.56% y una prolificidad de 8.48 ± 0.17 gazapos por camada. El

porcentaje de fertilidad obtenido en este estudio para los diluyentes TY y TL fue del 40%, en ambos casos, a las 24 horas de refrigeración. No obstante, el tamaño de camada para el diluyente TL fue de 8.5 ± 2.1 gazapos por camada; resultados comparables por los obtenidos por los últimos autores mencionados, incluso, donde fue utilizado un diluyente comercial. Por otra parte la prolificidad obtenida con el diluyente TY fue de 4 ± 2.8 gazapos, en el mismo tiempo de refrigeración que los anteriores autores emplearon.

En el presente estudio, no fue posible llevar a cabo una correlación entre las variables de movilidad, morfología normal e integridad de la membrana plasmática y acrosomal con los parámetros reproductivos de fertilidad y prolificidad en hembras inseminadas (Brun *et al.*, 2016), debido a que nuestro conjunto de datos fue insuficiente para estimar con precisión las correlaciones de calidad espermática respecto a la capacidad de fertilización. No obstante, el presente estudio proporciona la oportunidad de comparar simultáneamente, el desempeño de dos diluyentes (TY y TL), y demuestra que mantienen los indicadores de calidad espermática *in vitro*, durante 24 horas de almacenamiento en refrigeración, con potencial de fertilización.

Si bien, no podemos referirnos a una correlación propiamente dicha, se observa una tendencia en la disminución de los porcentajes de fertilidad, respecto al diluyente TY, encontrando una reducción gradual de este parámetro, conforme transcurre el tiempo de refrigeración de los espermatozoides, logrando un 80% de fertilidad a las 2 horas, 60% a las 4 horas y 40% a las 24 horas post-refrigeración. No así para el diluyente TL, el cual, para las 2 y 24 horas, obtuvo un 40% de fertilidad comparado con un 100% a las 8 horas post-refrigeración.

La condición fisiológica también influye en el porcentaje de fertilidad. Rebollar *et al.*, 1992, informaron que el porcentaje de fertilidad en conejas nulíparas es más alta que en conejas en periodo de lactancia. García y Rodríguez, 2002, apoyan esta afirmación, quienes manifiestan que, la prolactina liberada en respuesta a la succión de los gazapos en conejas lactantes, interfiere en el control de los estrógenos foliculares sobre la FSH y sobre el ovario, alterando los procesos que desencadenan la ovulación. La lactación, por tanto, es la principal responsable de que haya un porcentaje superior de conejas no receptivas, y que los resultados de fertilidad

sean del orden del 50%, para las dos primeras semanas posteriores al parto. En contraparte, en conejas nulíparas de edad y peso adecuados, la inducción a la ovulación con GnRH, no ha presentado problemas en cuanto a la fertilidad, ya que en los ovarios de estas conejas, siempre existe un número elevado de folículos capaces de ovular. Esto se refuerza, por los resultados obtenidos en este estudio, donde independientemente del tipo de semen utilizado para la inseminación (fresco o refrigerado), se obtuvieron porcentajes de fertilidad del 100%, tanto para el control como para el semen refrigerado durante 8 horas, con el diluyente TL.

El tamaño de camada obtenido en este estudio, es inferior o igual a otros estudios realizados, como los mencionados anteriormente. Una de las razones del porque su relación, es la temporada del año en el cual ocurrieron los partos (marzo). Bhatt *et al.*, 2002, encontraron que el tamaño y peso de la camada al nacimiento, así como el tamaño de la camada al destete, eran todos mayores durante la época de invierno, en comparación con los que ocurrían durante épocas calurosas como la primavera, el verano y la temporada lluviosa. Por otra parte, Szendro, 2000, encontró que el orden en el número de parto influye sobre el tamaño de la camada, que es en promedio, sustancialmente más baja, en el primer parto que en las camadas posteriores. El tamaño de camada más grande, se presenta entre el segundo y tercer parto, disminuyendo de manera gradual en los partos posteriores. Respecto a los resultados obtenidos en este estudio, podemos mencionar que el parto de las hembras inseminadas sucedió en primavera, además de ser hembras nulíparas, y por ende, su primer parto. Siendo entonces, algunas de las razones para la obtención de un número de camada inferior, respecto al óptimo, que es de entre 7 y 8 gazapos por camada (Alvariño, 2000), reportando para este estudio tamaños de camada entre 4 ± 2.8 a 6 ± 2.8 , exceptuando 8.3 ± 8.3 para el diluyente TY a las 8 horas de refrigeración y 8.5 ± 2.1 para el diluyente TL a las 24 horas post-refrigeración.

Debe tenerse en cuenta que la máxima expresión de la capacidad reproductiva de la coneja se presenta hasta el tercer parto de su vida reproductiva, reflejada por la capacidad de los órganos reproductores para alojar un número mayor de productos. Así, Aragón *et al.*, 2010, señalan que el tamaño y características del útero, dependen del estadio reproductivo; en hembras jóvenes es de superficie lisa y presenta escasa masa muscular; por lo que al desarrollar la función

reproductiva y la participación de los estrógenos con actividad morfogénica y proliferativa sobre los tejidos uterino, ovárico y vaginal, promueve el aumento de tamaño en estas estructuras. Lo que puede explicar los resultados en cuanto al número de gazapos nacidos por camada.

Si bien, la raza Nueva Zelanda blanco, posee estándares característicos como alta prolificidad y habilidad materna (Mc Nitt *et al.*, 2000), debe considerarse la existencia de animales productores constituidos en base a diferentes líneas especializadas en parámetros reproductivos como: tasa de ovulación, desarrollo embrionario (Mehaisen *et al.*, 2005), prolificidad, precocidad sexual, frecuencia de celo, tasa de concepción, habilidad materna (Capra y Blumetto, 2014), así como rasgos heredables en relación a la morfometría espermática (Lavara *et al.*, 2013), aspectos que sin duda, influyen de manera directa sobre los resultados.

Son escasos los trabajos que proporcionan datos sobre la fertilidad y la prolificidad en hembras inseminadas artificialmente con semen refrigerado, empleando diluyentes a base de yema de huevo y leche descremada en conejos. Por lo que los resultados proporcionados en este estudio, son fundamentales, ya que demuestran que puede lograrse una fertilización exitosa, con el empleo de estos componentes en el diluyente de conservación.

Los efectos favorables de la yema de huevo y la leche descremada, para contrarrestar las alteraciones provocadas por el choque de frío, se encuentran ampliamente comprobados en la refrigeración del semen en diferentes especies domésticas. Sin embargo, los complejos mecanismos relacionados con esta protección, se encuentran actualmente bajo objeto de investigación. Nuestros resultados, reafirman la importancia que tiene la adición de la yema de huevo y la leche descremada al diluyente de conservación, mediante refrigeración del semen de conejo, dado los beneficios en la preservación de la movilidad, la estabilización de la membrana plasmática y acrosomal, los cuales demostraron ser suficientes para lograr la fertilización.

No obstante, estudios posteriores deberán contemplar factores que presenten relación directa con los parámetros evaluados en este trabajo, factores como: raza, estacionalidad reproductiva, línea genética, condición fisiológica, así como en el estudio de diferentes componentes del

diluyente de conservación seminal y su desarrollo; con el propósito, no solo de mejorar el mantenimiento y la funcionalidad de la célula espermática, sino de preservar el potencial de fertilización de los espermatozoides, bajo protocolos ya sea de refrigeración y/o congelación, con la finalidad de transmitir a futuras poblaciones cunícolas, las características, tanto reproductivas como productivas, competitivamente deseables.

CAPÍTULO IX. CONCLUSIÓN

- 1.** Los parámetros de calidad espermática del conejo, son alterados por el proceso de conservación a temperatura de refrigeración (5°C).
- 2.** La tolerancia del semen de conejo a la conservación en refrigeración a una temperatura de 5°C hasta las 24 horas, medida en términos del mantenimiento de los parámetros básicos de calidad espermática e integridad acrosomal, se encuentra influida por el tipo de diluyente utilizado.
- 3.** El diluyente elaborado con yema de huevo, presenta un mejor comportamiento protector a la temperatura de refrigeración, en relación al mantenimiento de los parámetros básicos de calidad espermática del conejo como lo es la movilidad, viabilidad espermática y la morfología normal comparado con el diluyente elaborado con leche descremada.
- 4.** Los diluyentes a base de yema de huevo y leche descremada, muestran un comportamiento similar respecto al mantenimiento de la integridad acrosomal del espermatozoide del conejo, almacenado hasta las 24 horas, a temperatura de refrigeración (5°C).
- 5.** Los parámetros reproductivos en las hembras inseminadas artificialmente con semen refrigerado de conejo, muestra un comportamiento independiente respecto al tiempo de conservación y el tipo de diluyente utilizado.
- 6.** Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo, se aconseja la utilización de la yema de huevo y la leche descremada como importantes componentes del diluyente de conservación para las dosis de semen de conejo a emplear en la inseminación artificial.

Capítulo X. REFERENCIAS

Aisen G. 2004. Producción ovina y caprina. Ed Intermédica. Buenos Aires. Argentina.

Albarracín M.J. 2005. Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica de Open Pulled Straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*. Tesis de Doctorado. Barcelona.

Almela V.L. 2014. Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos de la raza bovina Murciano Levantina: recogelación de espermatozoides. Tesis de Doctorado. Murcia

Almelar R.D; Dublin L y Schoenfeld C. 1980. Sperm motility. *Fertility and Sterility* 34:197-213.

Álvarez M.A. 2010. Influencia de diferentes estrategias reproductivas y nutricionales sobre la fisiología ovárica en conejas primíparas. Tesis de Doctorado. Madrid.

Alvariño M.R. 2000. Control de la Reproducción en el Conejo. Ed Mundi Prensa. México.

Allai L; Druartc X; Contell J; Louanjli N; Moula A; Badia A; Essamadi A; Nasser B y El Amiri B. 2015. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Animal Reproduction Science* 160:57-67.

Ambriz G.D; Contreras M.J; Hernández P.O; Mercado P.E; Cervantes R.F y Rosado G.A. 2003. *Acta Zoológica de México* 88:257-269.

Andrade M.A. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis de Doctorado. Madrid.

Aragón H.J; Suárez S.J y Pérez M.M. 2010. Características morfométricas de los órganos genitales de conejas Nueva Zelanda con distintos pesos corporales en el periodo de transición peripuberal. *Revista Veterinaria México* 41(3):211-218.

Aranda G. J. 2008. Caracterización de nuevos miembros de la familia MAL de proteínas. Tesis de Doctorado. Madrid.

Arenas R.E; Rodríguez T.A; López T.B; Retana S.F; Rodríguez T.E; Jiménez S.J y León G.M. 2014. Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1(7): 73-81.

Armas R. S. 2009. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos post orquiectomía. Tesis de Doctorado. Lima.

Aurich C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107:268-275.

Avila C.C. 2006. Efecto de la dilución, refrigeración y criopreservación del semen ovino sobre cambios celulares relacionados con la capacitación espermática. Tesis de Maestría. México.

Avilés L.K. 2011. Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. Tesis de Doctorado. Murcia.

Azeem S.A. 2010. Improving reproductive efficiency of rabbit does using hormonal, nutritional or acetic intra-vaginal washing treatments. Tesis de Doctorado. Cairo.

Barajas P.D. 2013. Expresión proteómica del plasma seminal del toro criollo San Martinero y su relación con la fertilidad y desarrollo embrionario *in vitro* en condiciones del trópico bajo colombiano. Tesis de Doctorado. Murcia.

Barbas J.P y Mascarenhas R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10:49-62.

Barrios A.D. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. Memorias XI Congreso Venezolano de producción e industria animal. Venezuela.

Bergeron A; Crête M.H; Brindle Y y Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction* 70(3):708-17.

Bergeron A y Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* 73:1338-1344.

Benson J.D; Wood E.J; Walters E.M y Critser J.K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78:1682-1699.

Bilbao M.M. 1996. Manejo en Inseminación Artificial: Factores que Afectan a la Calidad Seminal y al Índice de Fertilidad. *Boletín de Cunicultura* N° 85. España.

Bravo V.F. 2012. Estudio de la fracción proteica de leche y fórmulas infantiles sometidas a altas presiones. Tesis de Doctorado. Madrid.

Brito L. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in equine practice* 6: 249-264.

Brun J.M; Clément T.M y Bolet G. 2002. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 70:139-149.

Brun J; Sanchez A; Ailloud E; Saleil G y Theau-Clément M. 2016. Genetic parameters of rabbit semen traits and male fertilizing ability. *Animal Reproduction Science* 166, 15–21

Buxadé C y Sánchez S. 2000. El verraco: claves de su optimización productiva. Ediciones Euroganadería. Buenos Aires.

Caballero Ch y Villa G. 2010. Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de procesos productivos. Ed Universidad Nacional Autónoma de México.

Cabrera V.P y Pantoja A.C. 2012. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigación Veterinaria Perú* 23 (2): 192-200.

Cámara Y. 2005. Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. Tesis de Doctorado. Barcelona.

Cánovas S y Coy P. 2008. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Revista de Investigación Clínica* 60(5): 403-413.

Capra C y Blumetto O. 2014. Tecnología de producción de conejos para carne. Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA. Uruguay.

Cardinali R; Dal Bosco A; Mourvaki E; Del Vecchio M; Sartini B; Renieri T; Lasagna E y Castellini C: Rabbit semen particles: secretion pattern and main effect on the sperm functions. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 39:3-10.

Carluccio A; Robbe D; De amicis I, Contri A; Tosi Y; Russo F y Paoletti M. 2004. Artificial insemination in rabbits: laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Science* 12:65-79.

Carpio Ch. S. 2015. Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Tesis de Licenciatura. Quito.

Castellini C. 1996: Recientes avances en la inseminación artificial en conejos. *6th World Rabbit Congress*, Toulouse (2).

Castellini C. 2008. Buenas Prácticas en Inseminación Artificial I: Preparación de Dosis Seminales. *Boletín de Cunicultura*. N° 128. España.

Castellini C; Mourvaki E; Cardinali R; Collodel G; Lasagna E; Del Vecchio M y Dal Bosco A.2012: Secretion patterns and effect of prostate-derived granules on the sperm acrosome reaction of rabbit buck. *Theriogenology* 78, 715–723.

Castellini C, Mattioli S; Ruggeri S; Dal Bosco A y Collode G. 2013: The time-dependent effects of prostate granules and seminal plasma on the capacitation, acrosome reaction, and motility of rabbit sperm. *Animal Reproduction Science* 140, 97– 102.

Chabory E; Damon C; Lenoir A; Henry-Berger J; Vernet P; Cadet R; Saez F y Drevet J. R. 2010. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science* 88(4): 1321-1331.

Clément M.T. 2007. Preparation of the rabbit doe to insemination: a review. *World Rabbit Science* 15: 61-80.

Collodel G; Cardinali R; Moretti E; MattioliS; Ruggeri S y Castellini C. 2012: Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. *Theriogenology* 77, 1021–1026.

Cole H.H y Cupps P.T. 1977. Reproduction in domestic animals. 3° Ed. Academic Press. London

Contera C.A. 1988. Fisiología del Aparato Reproductor y Ritmos de Reproducción en Cunicultura. *Boletín de Cunicultura*. N° 43. España.

Corona L. J. 2014. Determinación de la distribución de balsas lipídicas (lipid rafts) y cuantificación del colesterol de la membrana de espermatozoides criopreservados de cerdo. Tesis de Maestría. México.

Crespilho A.M; Nichi M; Guastic P.N; Freitas-Dell'Aqua C.P; Sá Filho M.F; Maziero R.R; Dell'Aqua Jr J.A y Papa F.O. 2014. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science* 146:126-133.

Dacheux J. L y Dacheux F. 2013. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *The Society for Reproduction and Fertility*. Francia

Dal Bosco A; Cardinali R; Brecchia G; Rebollar P.G; Fatnassi M; Milláne P; Mattioli S y Castellini C. 2014. Induction of ovulation in rabbits by adding Lecirelin to the seminal dose: In vitro and in vivo effects of different excipients. *Animal Reproduction Science* 150: 44–49.

Dalton C. 2012. Mitochondrial dynamics during mouse oocyte maturation. Tesis de Doctorado. Londres.

Dean J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26: 29-38.

De Ambrogi M; Bellester J; Saravia F; Caballero I; Wallgren M; Andersson M y Rodríguez H. 2006. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology* 29: 543-552.

De Jonge C y Barratt R. 2006. *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.* Ed Cambridge University. United States of America.

Del Río M.J; Godoy A; Toro A; Arellana R; Cortés M; Moreno R y Vigil P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología* 5(4):368-373.

Di Lorio M. 2014. Cryopreservation of rabbit semen: effectiveness of different permeable and non-permeable cryoprotectants on post-thaw sperm quality and reproductive performances. Tesis de Doctorado. Italia.

Dorado J; Gálveza M.J; Murabito M.R; Muñoz-Serrano A y Hidalgo M. 2011. Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. *Animal Reproduction Science* 127:106-113.

Drobnis Z.E; Berger T y Crow J. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology* 265:432-437.

Edidin M. 2003. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature reviews. Molecular cellular biology* 4: 414-418.

El-Kelawy H; Tawfeek M; El-Gaafary M y Ibrahim H. 2012: Viability and fertilizing ability of extended rabbit semen stored at 5°C. World Rabbit Science Association. *Proceedings10 the World Rabbit Congress. Egypt.* 285 – 289.

England G.C. 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of reproduction and fertility. Supplement 47:* 243-255.

Epifano O y Dean J. 1994. Biology and estructura of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reproduction Fertility Development* 6:319-330.

Escribá V.P y Nicolson I.G. 2014. Membrane estructura and function: Relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1838: 1449-1450.

Fallas L.M. 2010: Suplemento con germinados de trigo como bioestímulo reproductivo en conejos machos. Tesis de Maestría. México.

FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Roma.

Farrell P; Foote R; Simkin M; Clegg E y Wall R. 1993. Relationship of semen quality, number of sperm inseminated and fertility in rabbits. *Journal of Andrology* 14, 464-471.

Ferramosca A y Zara., V. 2014: Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed Research International.* 1-8.

Ferrandini E; Castillo M; López M.B y Laencina J. 2006. Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia* 22: 5-18.

Ferrian S. 2007. Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post descongelacion. Tesis de Doctorado. España.

Florez-Rodriguez S.A; Paes A.R; Rodrigues A.M; Affonso J.F. MS; Fulaneti C.H; Menegon L.M; Lançoni R; Furugen C.A y Carvalho C.E.2014. Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science* 34:911-917.

Foot H.R. 2003. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science* 75:119–139.

Fox P.F. y Kelly A.L. 2004. The caseins. En: Proteins in Food Processing. Yada, R.Y. (Eds.). *Woodhead Publishing Limited*. Cambridge, pp. 29-71.

Fuentes V.O; Villagran C y Navarro J. 2004. Sexual behavior of male New Zealand white rabbits in an intensive production unit. *Animal Reproduction Science* 80: 157-162. México.

García R y Rodríguez M. 2002. Evolución del manejo reproductivo en cunicultura. *Boletín de Cunicultura* 124: 6-15.

Garde J.J; Del Olmo A; Soler A.J; Espeso G; Gomendio M y Roldan E.R. 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science* 108:384-401.

González M.G. 2006. El estudio de la neurobiología del conejo y su relevancia para la cunicultura. Cinvestav. México.

Gottardi L. 1993. Conservazione a medio-lingo del material seminale di coniglio. *Revista de Cunicultura* 5:31-38.

Guevara ND. 2001: Evaluación reproductiva de la utilización de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y gonadotropina coriónica humana (HCG) post inseminación artificial en cerdas multíparas. Tesis de Licenciatura. Ecuador.

Guthrie H.D y Welch G.R. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78: 1700–1708.

Hafez B y Hafez S.E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed McGraww Hill Interamericana. México.

Halliwell B y Gutteridge. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. 5° Ed.

Hancock J.T; Desikan R y Neill S.J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* 29, part 2.

Harue T.R; Paes A.R; Serrano-R.E; Martins O.B; Florez-Rodriguez S.A; Bianchi R.M; Lançonni R; Nichi M y Carvalho C.E. 2015. Addition of pentoxifylline to skim milk-based extender on frozen-thawed equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 35: 823-829.

Hernández E.J; Fernández F.R; Avalos A.R; Díaz R.B y Olvera F.A. 2004: Efecto de la adición de gelatina a semen de conejo almacenado a 12°C. *Revista Salud Animal* 26(3): 197-201.

Hernández D.A. 2013. Viabilidad y función espermática de semen descongelado de porcino adicionado con plasma seminal homólogo. Tesis de Maestría. México.

Holt W y Fazeli A. 2010. The oviduct as a complex mediator and mammalian sperm function and selection. *Molecular Reproduction Development* 77: 934-943.

Hu J.H; Jiang Z.L; Lv R.K; Li Q.W; Zhang S.S; Zan L.S; Li Y.K; Li X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62(1):83-7.

Iaffaldano N y Rosato P.M. 2012. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 78:1381-1389.

Iaffaldano N; Di Iorio M; Rosato M.P y Manchisi A. 2014. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk of sucrose. *Animal Reproduction Science* 151: 220-228.

Inaba K. 2011. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction*. 17(8): 524–538.

Jacob R.A. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research* 15(5): 755-766.

Januskauskas A; Johannisson A; Soderquist L y Rodriguez-Martinez H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy ai bulls. *Theriogenology* 53:859-875.

Jerez-Ebensperger R.A; Luño V; Olaciregui M; González N; De Blas I y Gila L. 2015. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Ruminant Research* 130:153-156.

Jiménez M y Vicente A. 2012. Biotecnología de la reproducción en especies ganaderas. Ed Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.

Jiménez P; Serrano-Meneses M.A; Cuamatzi E y González M.G. 2012. Analysis of sexual behaviour in male rabbits across successive test leading to sexual exhaustion. *World Rabbit Science* 20: 13-23. España.

Kinnula L.V y Crapo D.J. 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology & Medicine* 36 (6): 718-744.

Klinovska K; Sebkova N y Dvorakova-Hortova K. 2014. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* 15:10652-10668.

Knobil E y Neill D.J.2006. *Physiology of reproduction*. 3° Ed. Academic Press is an imprint to Elsevier. EUA.

Krishnakumar S; Whiteside D.P; Elkin B y Thundathil J.C. 2011. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* 76:252-260.

Konig H y Liebich H. 2008. Anatomía de los animales domésticos. Ed Médica Panamericana. México.

Kumar P; Sainia M; Kumara D; Balharaa A.K; Yadav S.P; Singh P y Yadav P.S. 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 159:38-45.

Laborda V. 2011. Selection for ovulation rate in rabbits. Tesis de Doctorado. Valencia.

Laca A; Paredes B; Rendueles M y Díaz M. 2015. Egg yolk plasma: Separation, characteristics and future prospects. *LWT-Food Science and Technology* 62:7-10.

Lattanzi L.M. 2010. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinós. Tesis de Doctorado. Buenos Aires.

Lavara R; Mocé E y Vicente J. 2003. Buenas prácticas en inseminación artificial 1: Preparación de dosis seminales. Los factores responsables de la variación de los resultados de fertilidad y prolificidad de la IA. *Boletín de cunicultura*. 128: 14-23.

Lavara R; David I; Mocé E; Baselga M y Vicente S. 2013: Environmental and male variation factors of freezability in rabbit semen. *Theriogenology* 79, 582–589.

Lavara R; Vicente J y Baselga M. 2013. Genetic variation in head morphometry of rabbit sperm. *Theriogenology* 80: 313-318.

López-Brea G.J. 1992. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis de Doctorado. Madrid.

López. F.J y Alvariño J.M. 1998. Artificial insemination of rabbits whit diluted semen stored up to 96 hours. *World Rabbit Science* 6(2): 251-253.

Luzi F y Crimella C. 1998. Effect of change of cage 2 days before artificial insemination on reproductive performance of rabbit does. *World Rabbit Science* 6 (1): 195-198.

Maertens L y Luzi F. 1995. Effect of diluent and storage time of rabbit semen on the fertility of does reared under two different lighting schedules. *World Rabbit Science* 3(1):27-34.

Malmgren L. 1997. Assessing the quality of raw semen: A review. *Theriogenology* 48:523-530.

Manal A.F. 2010. Flushing or dor relocation as biostimulation methods for improvement of sexual behavior and performance on multiparous rabbit doe after a summer resting period. *World Rabbit Science* 18: 151-158.

Martínez C. 1993. Cunicultura. Ed Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez M. 2002. Estudio de la fecundación “in vitro” en porcino: reducción de la poliespermía y optimización de la producción “in vitro” de embriones. Tesis de Doctorado. Madrid.

Martínez R.R; Hernández I.J; Hernández H.H; Michel A.A y Valencia M.J. 2006. Inseminación artificial intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado. *Revista Agrociencia*. N° 40. México.

Martínez J.G y Pardo C.S. 2010. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta biológica Colombiana* 15(2): 3-24.

Martins. C.A. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis de Doctorado. Madrid.

Mc Donald L. 1991. Endocrinología veterinaria y reproducción. Ed Interamericana Mc Graw Hill.

Mc Nitt I.J; Patton M.N; Cheeke R.P y Lukefahr D.S. 2000. Rabbit Production. 8° Ed. Interstate Publishers. Estados Unidos.

Medrano E.A. 2005. Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. Tesis de Doctorado. Barcelona.

Mehaisen G; Vicente J; Lavara R y Viudes de Castro M. 2005. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and *in vitro* development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Animal Reproduction Science* 90: 175-184.

Mendoza A.B. 2001. Situación de la Cunicultura en México. *Revista Lagomorpha*. N° 117. España.

Mocé E y Vicente J.S. 2009. Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Animal Reproduction Science* 110: 1-24.

Mocé E; Lavara R y Vicente J. 2010. Effect of cooling rate to 5°C, straw size and farm on fertilizing ability of cryopreserved rabbit sperm. *Reproduction in domestic animals* 45: 1-7.

Mocé E; Blanch E; Talaván A y Viudes de Castro M.P. 2014. Reducing the time rabbit sperm are held at 5°C negatively affects their fertilizing ability after cryopreservation. *Theriogenology*. 82: 1049-1053.

Montenegro U. V y Chimarro C. M. 2013. Evaluación del efecto de dos tipos de diluyentes comerciales en semen porcino para inseminación artificial en reproductoras de tercer y cuarto parto en el Cantón Ibarra. Tesis de Licenciatura. Ecuador.

Moore K.L; Persaud T.V y Torchia M.G. 2013: *Embriología clínica* 9° Ed. Ed Elsevier Saunders. España.

Mortimer T.S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *European Society for Human Reproduction and Embryology* 3 (5): 403–439.

Mourvaki E; Cardinali R; Dal Bosco A y Castellini C. 2010. In vitro antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8(16):1-7.

Moussa M; Martinet V; Trimeche A; Tainturier D y Anton M. 2002. Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57:1695-1706.

Myles D.G y Primakoff P. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of reproduction* 56: 320-327.

Najarro G.J. 2004. Evaluación del uso de leche descremada fluida UHT como extensor de semen porcino sobre la fertilidad y número de nacidos totales en cerdas inseminadas. Tesis de Maestría. Guatemala.

Negatu Z y Mc Nitt J. 2002. Hormone profiles and nest-building behavior during the periparturient period in rabbit does. *Animal Reproduction Science*. 72: 125-135.

Nicolson G. 2014. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838:1451-1466.

Olivares C.A. 2012. Criocapacitación de espermatozoides caprinos procesados con diferentes concentraciones de glicerol y dextrosa. Tesis de Licenciatura. México.

Ortega B.E. 2012. Factores genéticos y ambientales que afectan el comportamiento reproductivo de conejas Nueva Zelanda, California y Chinchilla. Tesis de Maestría. México.

Palsdottir H y Hunte C. 2004. Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666(1-2):2-18.

Parks J.E y Graham J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38(2):209-222.

Peña F.J. 2015. New aspects of sperm physiology and sperm oocyte interactions. *Animal Reproduction*. 12(3): 359-365.

Pichardo H.J y Reyes F.F. 2005. Reproducción de siete especies domésticas. Ed Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Pillet E; Duchamp G; Batellier F; Beaumal V, Anton M; Desherces S; Schmitt E y Magistrini. M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 75:105-114.

Pillet E; Labbe C; Batellier F; Duchamp G; Beaumal V; Anton M; Desherces S; Schmitt E y Magistrini M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77:268-279.

Prentice J.R y Anzar M. 2011. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal Genetics. *Veterinary Medicine International* 11: 1-12.

Primakoff P y Myles D. 2002. Penetration, adhesión, and fusión in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296:2183-2185.

Puente M.A y Tartaglione M. 2013. Evaluación de tres diluyentes sobre la calidad de semen de conejo. *Revista Veterinaria Argentina* 30(298).

Quiles A y Hevia M.L. 1995. Bases Fiziootécnicas de la reproducción en cunicultura. *Revista Ganaderia*. 270-273.

Quintero M.A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis de Doctorado. Bellaterra.

Quinn P.J y White I.G. 1966. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 12:263-270.

Rebollar P; Ubilla E y Rodríguez J. 1992. Influence of the parturition-insemination interval on the conception rate in rabbits artificially inseminated with fresh semen. *Journal of Applied Rabbit Research* 15: 407–411.

Rebollar G; Dal Bosco A; Millán P; Cardinali R; Brecchia G; Sylla L; Lorenzo L y Castellini C. 2011. Ovulating induction methods in rabbit does: the pituitary and ovarian responses. *Theriogenology* 77:292–298.

Rebollar P. G; Milanés A; Pereda N; Millán P; Cano P; Esquifino A.I; Villarroel M; Silván G. y Lorenzo P.L. 2006. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reproduction Science* 93: 210-230.

Regalado S.F. 1992. Proteínas de secreción del epidídimo de conejo: caracterización y regulación por andrógenos y temperatura. Tesis de Doctorado. Madrid.

Restrepo B. G; Pizarro L.E y Rojano B.A. 2012. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación* 9 (1): 128-136.

Rijsselaere T; Van Soom A; Maes D; Verberckmoes S y Kruif A. 2004. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 61:1589-1602.

Risopatrón J; Catalán S; Sepúlveda N y Sánchez R. 2005: Efecto de diferentes concentraciones de heparina sobre la capacitación espermática in vitro en canino. *Revista Científica FCV-LUZ* 15 (6).

Rizzo A; Roscino M.T; Binetti F y Sciorsci R.L. 2012. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 344-352.

Robaire B y Viger R. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*. 52: 226-236.

Roca J; Martínez S; Vázquez J.M; Lucas X; Parrilla I y Martínez E.A. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Animal Reproduction Science* 64:103-112.

Roca T. 2012. España, relegada al quinto lugar de producción de carne de conejo. *Boletín de Cunicultura*. N° 144. España.

Rodríguez DL. R; Fallas L.M; R. Rangel S.R y V. Mariscal A.V. 2003. Influence of short-term relocation and male exposure on sexual receptivity and reproduction in artificially inseminated doe rabbits. *Animal Reproduction Science* 78: 111-121.

Rodríguez T.E. 2011. Análisis macro y microestructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis de Doctorado. México.

Röpke T; Oldenhof H; Leiding C; Sieme H; Bollwein H y Wolkers W.F. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* 76:1465-1472.

Rosales T. A y Guzmán S. A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Revisión. *Técnica Pecuaria México*. 46(2):159-182.

Rosato M.P; Rebollar P.G y Iaffaldano N. 2006. Comparación de diferentes diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su conservación. XXXI Simposium de Cunicultura. España.

Saavedra L.M. 2009. Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados *in vitro*. Tesis de Doctorado. Murcia.

Safaa M; Vicente S; Lavara R y Viudes de Castro P. 2008. Semen evaluation of two selected lines of rabbit bucks. *World Rabbit Science* 16: 141 – 148.

Salamon S y Maxwell W.M. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62:77-111.

Salinas P; Pezo F; Sánchez R y Risopatrón J. 2014. Validación de SYBR-14 y 6-CFDA para evaluar la viabilidad e integridad de la membrana plasmática en espermatozoides caninos de raza Chihuahua. *International Journal of Morphology* 32(1):16-21.

Salvador V.J y Jiménez F.M. 2013. Live birth from slow-frozen rabbit oocytes after *in vivo* fertilization. *Plos One* 8: 1-8.

Salvetti P; Buff S; Afanassieff M; DanielN; Guérin P y Joly T. 2010. Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenology* 74: 847–855.

Sánchez R.A; Cartagena P.A y Berland O.M. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigación Veterinaria Perú.* 17 (1): 1-7.

Sarıözkan S; Türk G; Cantürk F; Yay A; Eken A y Akçay A. 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology* 67:1-6.

Sariozkan S; Ozdamar S; Turk G; Canturk F y Yay A. 2014: In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 68, 349–353.

Si W; Hildebrandt T; Reid C; Krieg R; Ji W; Fassbender M y Hermes R.2006. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology* 65:788-798.

Skinner K.M. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction*. 1-11.

Swaigood H.E. 1992. Chemistry of the caseins. *Advanced Dairy Chemistry- 1: Proteins*. Ed. P.F. Fox, *Elsevier Science Publishers*. Londres. Pp: 63-110.

Tabarez R.A. 2014. Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción blanca de rasquera. Tesis de Doctorado. Barcelona.

Talib B.A; Bomboi G y Floris B. 2013. Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. *Small Ruminant Research* 113:405-410.

Tejerina A.F. 2007. Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. Tesis de Doctorado. España.

Terreros C.M; Huanca L.W; Arriaga C.I y Ampuero B.A. 2015. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Alpaca. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*. 26(3): 420-426

Torres G.A. 2012. Aceptación y disponibilidad a pagar de los consumidores por la carne de conejo. Tesis de Maestría. México

Trounson A; Anderiesz C y Jones G. 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 121: 51–75.

Vega M.D; Barrio M; Quintela L.A; Becerra. J; Cainzos J; Prieto A; Rodríguez-Zamora A y Herradón P.G. 2012: Evolución del manejo reproductivo en cunicultura. *Información técnica económica agraria* 108(2): 172-190.

Veiga M.F. 2011. Estudios sobre la presencia y expresión de cadherina epitelial en gametas humanas y murinas. Evidencias sobre su participación en el proceso de la fecundación. Tesis de Doctorado. Buenos Aires.

Vicente J; Lavara R; Lavara F; Jiménez M y Viudes de Castro M. 2008. Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. *Livestock Science* 115: 153-157.

Voronina E y and Wessel G.M. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, Inc Vol. 58.

Wang C.L; Xu H.Y; Xie L; Lu Y.Q; Yang X.G; Lu S.S y Lu K.H. 2016. Stability of the cytoskeleton of matured buffalo oocytes pretreated with cytochalasin B prior to vitrification. *Cryobiology* 72: 274-282.

Walstra P y Jenness R. 1984. Protein composition of milk. *Dairy Chemistry and Physics*. Ed. John Willey & Sons, Nueva York, USA, pp. 106-108.

Wassarman M.P y Litscher S.E. 2008. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *The International Journal of Developmental Biology*. 52: 665-676.

Yanagimachi R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2: 371-372.

Zaniboni L; Gliozzi T; Maldjian A; Luzi F y Cerolini S. 2004. Fatty acid and tocopherol composition of semen components in the rabbit. *Proceedings 8th World Rabbit Congress*. Puebla, México.

Zapletal D y Pavlik A. 2008: The effect of lecorelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. *Animal Reproduction Science* 104:306–315.

Zepeda B.J. 2013. Genotipificación para κ -caseína, β -caseína y β -lactoglobulina en bovinos Jersey. Tesis de Maestría. México.

APÉNDICES

ANIMAL			PARÁMETROS DE CALIDAD			
FECHA DE EXTRACCIÓN	ESTADO SANITARIO	N° SEMENTAL	ASPECTO	COLOR	VOLÚMEN (ml)	GEL

Apéndice 1. Formato de registro para evaluación macroscópica del eyaculado.

MEDIO Y TIEMPO DE CONSERVACIÓN				PARÁMETROS DE CALIDAD							
N° SEMENTAL	F.E	M.C	T.E	M.M	M.P	% E.V	% E.M	% M.N	% A. CABEZA	% A. CUELLO	% A. COLA

Apéndice 2. Formato de registro para evaluación microscópica del eyaculado.

FE= Fecha de evaluación. **MC**= Medio de conservación. **TE**= Tiempo de evaluación. **MM**= Movilidad masal. **MP**= Movilidad progresiva.
EV= Espermatozoides vivos. **EM**= Espermatozoides muertos. **MN**= Morfología normal. **A**= Anormalidades

ANIMALES			INSEMINACIÓN ARTIFICIAL			INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN
N° JAULA	N° HEMBRA	ESTADO SANITARIO	FECHA	MEDIO DE CONSERVACION	TIEMPO DE CONSERVACION	DOSIS

Apéndice 3. Formato de registro de control reproductivo – inseminaciones

ANIMALES		D.G	PARTO		
N° JAULA	N° HEMBRA		FECHA	TOTAL DE GAZAPOS NACIDOS	PESO DE LA CAMADA

Apéndice 4. Formato de control de parámetros reproductivos en hembras inseminadas artificialmente