

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

COMPARACIÓN DE LA FERTILIDAD DE CONEJAS CRIOLLAS INSEMINADAS  
ARTIFICIALMENTE CON SEMEN CONGELADO USANDO 2 DIFERENTES  
MEDIOS (AMIDAS CON LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD VS AMIDAS Y  
YEMA DE HUEVO).

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**JOSÉ LUIS CATANA LEÓN**

Asesores:

MVZ. MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez  
MVZ. MC. Miguel Ángel Martínez Castillo

México, D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis hijos José Iván, Víctor y Juan Luis porque son mi fuerza y el impulso de vivir y cumplir mis metas cada día. Los adoro y estimo hijos.

A mi esposa Lupita, a tu paciencia y comprensión; preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para ti, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis maestros que influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los profesores MVZ. MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez y MVZ. MC. Miguel Ángel Martínez Castillo por su disponibilidad y asesoría académica, por permitirme trabajar en el tema, por la confianza y apoyo que me dieron para poder realizar este proyecto.

A la MVZ. Guadalupe Hilda Jandete Díaz por su colaboración y permitirme obtener muestras de los sementales.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica.

A los miembros del jurado, que gracias al tiempo que dedicaron en revisar esta tesis la enriquecieron con sus aportaciones.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo	6
Hipótesis	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
Colección y evaluación del semen	7
Cálculo de la concentración de espermatozoides	8
Diagrama de flujo	10
RESULTADOS	11
Análisis estadístico	11
DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	17
REFERENCIAS	18
CUADROS	21
FIGURAS	23
FOTOGRAFÍAS	27

## RESUMEN

CATANA LEON JOSÉ LUIS. Comparación de la fertilidad de conejas criollas inseminadas artificialmente con semen congelado usando 2 diferentes medios (Amidas con lipoproteínas de baja densidad vs Amidas y yema de huevo). (Bajo la dirección de: MVZ. MPA. J. Alberto Balcázar Sánchez y MVZ. MC. Miguel Ángel Martínez Castillo).

La utilización de la inseminación artificial permite la multiplicación de los machos portadores de características genéticas sobresalientes. La práctica exitosa de esta técnica, implica la obtención de semen, su preservación adecuada, su dosificación correcta y su depósito apropiado dentro del fondo vaginal de la coneja. Dentro de este proceso, la preservación del semen de conejo ha sido particularmente difícil a diferencia de otras especies, ya que en el conejo no existen diluentes apropiados para mantener la viabilidad de los espermatozoides colectados; por lo tanto, hacen falta estudios en México que nos permitan conocer una forma de criopreservación adecuada para mantener el semen en óptimas condiciones durante el traslado y su proceso para la descongelación del mismo.

El objetivo fue comparar la fertilidad de conejas criollas inseminadas artificialmente con semen congelado, utilizando como diluyente la combinación de amidas y lipoproteínas de baja densidad vs amidas y yema de huevo.

Se inseminaron 10 hembras con semen con lipoproteínas y amidas y 10 con semen con yema de huevo y amidas. Posteriormente se realizó el diagnóstico de gestación 14 días después de la inseminación mediante palpación abdominal ventral externa.

No se observó diferencia significativa entre la proporción de hembras gestantes atribuible al diluyente del semen. Se concluye, que ambos diluentes utilizados permitieron la conservación del semen de conejo exitosamente y se alcanzó el

objetivo de criopreservar semen de conejo y mantener su viabilidad, comprobando su utilidad mediante la inseminación de conejas y verificando su gestación.

## INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica ideada y desarrollada especialmente para estimular el mejoramiento genético del ganado. Su utilización permite la multiplicación exclusiva de los machos portadores de características genéticas sobresalientes. La práctica exitosa de esta técnica, implica la obtención de semen, su preservación adecuada, su dosificación correcta y su depósito apropiado dentro del fondo vaginal de la coneja. Dentro de este proceso, la preservación del semen de conejo ha sido particularmente difícil a diferencia de otras especies, ya que en el conejo no existen diluentes apropiados para mantener la viabilidad de los espermatozoides colectados (Stranzinger *et al*, 1971; Maurer *et al*, 1976; Hanada y Nagase, 1980; El-Gaafary, 1994; Fargeas *et al*, 1995). Una solución que permite diluir el semen y preservar las características biológicas de los espermatozoides técnicamente es denominada “extender”. Históricamente, en los años 20`s se trató de mantener el espermatozoide de un toro en un extender (solución de Locke) a 2 °C y transportarlo para ser utilizado para la inseminación artificial. En los 40`s, se encontró que la temperatura óptima para mantener viables a los espermatozoides era de 0°C. De igual manera, en esos años se descubrió el efecto crioprotector del glicerol, lo cual constituyó un avance muy importante pues facilitó la preservación de gametos. Un factor elemental en la preservación de semen ha sido el congelamiento, mismo que ha sido aplicado mediante hielo seco y nitrógeno líquido, sin embargo, durante años algunos autores han estudiado los efectos colaterales de estas técnicas en muestras de espermatozoides de diferentes especies animales como: toro, caballo, cabra y borrego entre otros (Bailey *et al*, 2000; Yoshida 2000; Watson *et al*, 2000; Medeiros *et al*, 2002). En conejos los métodos para la IA se basan principalmente en la dilución del semen y su mantenimiento bajo refrigeración durante varios días; los espermatozoides de conejo son muy susceptibles a daños causados por soluciones hipertónicas y crioprotectores, obteniendo efectos negativos en la supervivencia, la movilidad y la integridad de su acrosoma (El-Gaafary 1994).



La IA en conejas está ampliamente extendida en los países europeos, obteniéndose resultados de fertilidad cercanos a los de la monta natural (Viudes-de-Castro 1996), cuando se utiliza semen fresco diluido de 6 a 12 horas después de ser colectado, sin embargo, esta práctica es difícil porque la viabilidad de los espermatozoides disminuye rápidamente y al no poderlo preservar (congelar) hay una pérdida de su capacidad fertilizante (Rosato *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha observado una disminución significativa en la fertilidad en conejas cuando se utilizan muestras de semen congelado (Stranzinger *et al.*, 1971; Maurer *et al.*, 1976; Hanada y Nagase, 1980; Fargeas *et al.*, 1995).

La calidad del espermatozoide después de descongelar está determinada no solamente por la calidad del macho y del espermatozoide por sí mismos, sino también depende de diversos factores tales como:

-Diluyente: el cual está compuesto por nutrimentos, crioprotectores, estabilizadores de pH y otros factores: como el tiempo de preservación, forma de congelación y de descongelación.

-La forma de empaque: en el conejo, el semen congelado en pajillas de plástico o en pellets (botones), ha reportado resultados similares con respecto a la motilidad espermática, utilizando volúmenes de 0.25 a 0.5 ml; sin embargo, el porcentaje de gestación es levemente mayor si se utiliza la pajilla, en lugar del pellet, para congelar el semen (Weitze. *et al.*, 1976).

El glicerol se ha utilizado como crioprotector en algunas especies, debido a que en la membrana del espermatozoide se encuentran unos canales que permiten la entrada del glicerol desplazando el agua, sin embargo, en los espermatozoides de conejo no son muy permeables al agua por lo que se presume que tienen una menor cantidad de canales, lo que afecta a la entrada del glicerol por lo que no es un buen crioprotector de estos espermatozoides. Por lo tanto, el glicerol utilizado como crioprotector para la congelación de espermatozoides de conejos no es considerado eficaz (Sawada *et al.*, 1964; Kashiwazaki *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2007). Se han

utilizado otros diluentes en conejo, aparentemente con resultados aceptables. En algunos estudios, se ha demostrado que el uso del Dimetilsulfóxido (DMSO), acetamida, trealosa, metil-celulosa y sacarosa (sucrosa) entre otras sustancias, como crioprotectores para congelar el semen del conejo da buenos resultados (Sawada *et al*, 1964, Dalimata *et al*, 1997, Vicente *et al*, 1996).

En un estudio hecho por Kashiwazaki y col. (2006) hicieron la siguiente comparación de crioprotectores glicerol, acetamida, lactamida y dimetilsulfóxido (DMSO) en espermatozoides de conejo blanco de Japón dando como resultado una movilidad de  $17.0\pm 3.3\%$  (glicerol),  $37.8\pm 3.0\%$  (lactamida),  $28.3\pm 3.8\%$  (acetamida) y  $25.3\pm 3.5\%$  (DMSO) y una integridad de membrana de  $17.0\pm 2.6\%$  (glicerol),  $35.9\pm 3.3\%$  (lactamida),  $30.2\pm 3.0\%$  (acetamida) y  $27.0\pm 2.4\%$  (DMSO), observando que a la concentración 1.0 molar (M) de lactamida o acetamida o DMSO tienen mejores efectos crioprotectores que a 1.0 M de glicerol para espermatozoides del conejo blanco de Japón.

En otro estudio Okuda (2007) comparó a la acetamida y al glicerol como crioprotector en el semen del conejo blanco de Japón, donde se observó que la velocidad de movilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides congelados con acetamida fueron significativamente más altos que aquellos congelados con glicerol.

Los espermatozoides congelados con glicerol dieron lugar a una fertilidad extremadamente baja en los primeros estudios de congelación de los espermatozoides de conejo (Sawada *et al* 1964; O'Shea *et al* 1969; Stranzinger *et al* 1971). Por tal motivo, desde los años 80's, la investigación comenzó a emplear a la acetamida como crioprotector de semen de conejo (Dalimata, 1997; Hanada, 1980; Moriya, 1996; Parrish, 1986). Además, la combinación con un azúcar como la sacarosa puede aportar mejores resultados al congelar semen (Viudes-de-Castro y Vicente 1996; Vicente y Viudes-de-Castro 1996).

Existe una limitación en la difusión del semen de donadores de alta calidad, ya que hacen falta estudios en México que nos permitan conocer una forma de criopreservación adecuada para mantener el semen en óptimas condiciones y así evitar la muerte de espermatozoides durante el traslado y su proceso para la descongelación del mismo.

## **OBJETIVO**

Comparar la fertilidad de conejas criollas inseminadas artificialmente, utilizando como diluyente la combinación amidas y lipoproteínas de baja densidad vs amidas y yema de huevo.

## **HIPÓTESIS**

La fertilidad de las conejas inseminadas artificialmente con espermatozoides congelados con un diluyente de amidas y lipoproteínas de baja densidad es mayor que cuando se insemina con un diluyente a base de amidas y yema de huevo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El experimento se realizó en una granja de traspatio ubicada en la calle Ignacio Zaragoza # 3 A, Col. Sta. Cruz Tlapacoya, Ixtapaluca, Edo. de México.

Animales: Tomando en consideración que para el presente experimento se tuvieron a disposición dos sementales ya entrenados para la donación del semen, se decidió la utilización de ambos, uno de la raza Nueva Zelanda blanco y uno de la raza Belier, de 2 años de edad aproximadamente, así como a 20 hembras criollas en edad reproductiva múltiparas (entre uno y dos años de edad) (Figura 1).

### **COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL SEMEN.**

La recolección del semen se realizó con una vagina artificial adaptada, misma que requirió la utilización de agua a la temperatura apropiada: 42 °C; para facilitar la obtención de la muestra se utilizó una piel de conejo curtida sobre el antebrazo y se estimuló al conejo para la monta, la cual se logró y permitió que el semental eyaculara dentro de la vagina artificial, obteniéndose el semen en un recipiente ubicado en el extremo opuesto al de la entrada de la vagina artificial; inmediatamente después se procedió a evaluarlo y posteriormente a diluirlo. Se obtuvieron dos eyaculados por cada macho.

La evaluación macroscópica del semen consistió en ponderar su color y su olor, así como su volumen (Cuadro 1). En la evaluación microscópica se evaluó la morfología de los espermatozoides (Fotografía 1) y su movilidad (progresiva y el vigor), para finalmente calcular su concentración (Cuadro 2).

Se utilizó el siguiente diluyente con su respectiva fórmula:

El diluyente está compuesto por amidas (Dimetilformamida) al 4.5%, 1.4 ml de leche ultra pasteurizada light, sacarosa, glucosa, 2.25 ml de yema de huevo, 1000 UI de

penicilina en un volumen de 39.5 ml de agua desionizada. Cabe mencionar que con esta misma fórmula, se realizó otro diluyente al cual se le agregó 2.25 g de lipoproteína de baja densidad liofilizada (LDL) en lugar de yema de huevo. Se obtuvieron 2 eyaculados por conejo; cada uno se dividió en 2 muestras: una se diluyó con Dimetilformamida y lipoproteínas de baja densidad y la otra con Dimetilformamida y yema de huevo (Fotografía 2).

### **CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES:**

Para éste propósito, utilizamos como ejemplo el primer eyaculado del conejo Nueva Zelanda blanco.

Y para ello utilizamos la siguiente fórmula:

Concentración espermática móvil (CEM) o concentración total de espermatozoides vivos

CEM= (Concentración Espermática esp/ml) (% Movilidad) (Volumen del eyaculado).

CEM=  $(270 \times 10^6)(.90)(1.5) = \underline{364.5 \times 10^6}$  Es la concentración espermática móvil del primer eyaculado del conejo NZ.

#### **Cálculos para la dosificación del semen:**

En éste caso utilizamos la siguiente fórmula:

Número de dosis= CEM/Concentración espermática recomendada.

$364.5 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = \underline{18.23 \text{ dosis}}$  se obtuvieron del primer eyaculado del conejo NZ blanco.

Para el cálculo del volumen final ocupamos la fórmula:

Volumen final= (Numero de dosis) (volumen recomendado)

$18.63 \times 0.5 \text{ ml} = \underline{9.12 \text{ ml}}$  Es el volumen final.

Y para saber la cantidad de diluyente que se necesitaba usamos la siguiente fórmula:

Diluyente= volumen final – volumen del eyaculado.

$9.12 \text{ ml} - 1.5 \text{ ml} = \underline{7.62 \text{ ml}}$  Es la cantidad de diluyente que hay que agregar al semen del primer eyaculado del conejo NZ blanco.

Posteriormente se procedió a empaquetar las dosis en pajillas de plástico a una concentración de 20 millones de espermatozoides en 0.5 ml; estas fueron conservadas a 5°C durante 30 minutos (Fotografía 3); después se colocaron en una rejilla para exponerse a vapores de nitrógeno líquido (-80 °C) por 15 minutos (Fotografía 4); pasado éste lapso las pajillas se sumergieron a nitrógeno líquido (Fotografía 5) para posteriormente ser almacenadas en el tanque de este mismo elemento (Fotografías 6 y 7).

Cuando fue requerido se sacaron las pajillas del tanque de nitrógeno líquido (permanecieron 4 meses almacenadas en el tanque) (fotografías 8) y se procedió a descongelar las pajillas exponiéndolas a “Baño María” a una temperatura de 35°C (Fotografía 9), durante 30 segundos e inmediatamente después se verificó la movilidad de los espermatozoides para evaluar su viabilidad antes de aplicar la técnica de IA (Fotografías 10 y 11).

Para poder sincronizar la receptividad sexual en las conejas (Fotografía 12) y lograr la inseminación en grupo se les aplicó el día 0 del estudio Gonadotropina Coriónica equina<sup>1</sup> (eCG), por vía IM, a una dosis de 20 UI/coneja y 48 horas después se practicó la inseminación artificial.

Para depositar la dosis de semen en la vagina se utilizó un catéter semirrígido con la punta ligeramente curva (Fotografía 13). La coneja se colocó en posición decúbito ventral con el tren posterior ligeramente levantado, sobre el brazo izquierdo del ayudante, quién sujetó la piel de la región lumbar con la otra mano. El inseminador abrió los labios de la vulva e introdujo la pajilla con la curvatura hacia arriba (Fotografía 14) y después de pasar la pelvis se giró suavemente 180 grados sin dejar de introducirla (Fotografías 15 y 16). Cuando se calculó que la pajilla estaba en el sitio apropiado dentro de la vagina se presionó gentilmente el émbolo de la jeringa y se depositó el semen en la entrada de los cervix (Fotografías 17,18 y 19).

---

<sup>1</sup> FOLLIGON, Intervet.

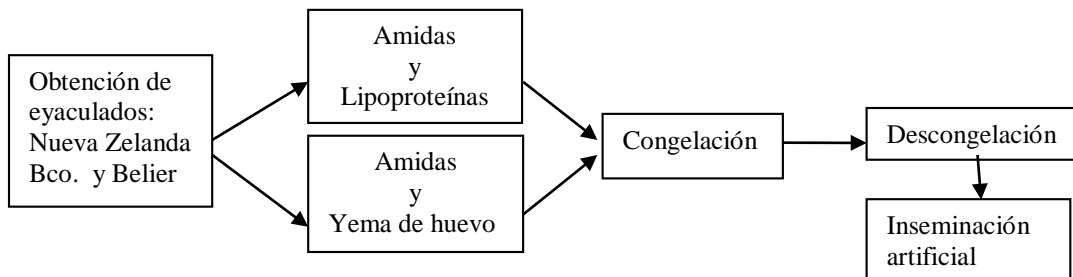
Una vez terminada la técnica de IA se aplicó Gonadorelina<sup>2</sup> (análogo de GnRH) a cada coneja, en una dosis total de 20 microgramos, por vía IM, para estimular la ovulación (Viudes-de-Castro y Vicente 1996; Vicente y Viudes-de-Castro 1996) (Fotografías 20 y 21).

Se inseminaron 10 hembras con semen con lipoproteínas y amidas, 5 con semen del macho Belier y 5 con semen del macho Nueva Zelanda. También se inseminaron 10 hembras con semen con yema de huevo y amidas, de las cuales 5 se inseminaron con semen del macho Belier y 5 con semen del macho Nueva Zelanda (Figura 2).

Tomando en consideración la recomendación de algunos autores (Hanada y Nagase, 1980; Moce y Vicente, 2002; Okuda *et al*, 2007) respecto a la dosis recomendada utilizando semen congelado, se aplicaron dos pajillas por coneja, dando un total de 40 millones de espermatozoides por hembra inseminada (Fotografía 22).

Posteriormente, mediante palpación abdominal ventral externa se realizó el diagnóstico de gestación 14 días después de la inseminación artificial (Fotografía 23).

## DIAGRAMA DE FLUJO



<sup>2</sup> FERTAGYL, Intervet.

## RESULTADOS

De 10 hembras que se inseminaron utilizando semen diluido con amidas y lipoproteínas de baja densidad (LDL), 6 quedaron gestantes, de las cuales 5 correspondieron a las inseminadas con semen del macho Belier y una del macho Nueva Zelanda; de 10 hembras que se inseminaron utilizando semen diluido con amidas y yema de huevo, 7 quedaron gestantes, de las cuales 5 fueron inseminadas con semen del macho Belier y 2 con semen del macho Nueva Zelanda (Cuadro 3).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados consistieron en determinar las proporciones de hembras gestantes en cada tratamiento y raza, para evaluar en qué condición (raza o tratamiento) dicha proporción fue mayor. Fue necesario utilizar la Prueba Exacta de Fisher en lugar de la  $X^2$  debido a que hubieron resultados con valores "0". La Prueba Exacta de Fisher se aplicó a un cuadro de dos criterios y dos condiciones en cada criterio, a nivel de significación estadística de  $\alpha = 0.05$ .

Los resultados fueron los siguientes:

#### **Evaluación del diluyente:**

Al agrupar los datos de las dos razas de machos, no se observó diferencia significativa entre la proporción de hembras gestantes atribuible al diluyente del semen  $P = 1.0$ .

#### **Evaluación de la Raza:**

La proporción observada de hembras gestantes fue significativamente mayor para la raza Belier  $P = 0.003$ .

#### **Evaluación de la interacción diluyente/raza:**

Se observó que la proporción de hembras gestantes fue significativamente mayor en la raza Belier para el diluyente LDL ( $P = 0.0476$ ), y no hay diferencias significativas para el diluyente Yema ( $P > 0.05$ ).



En general, de toda la población que se inseminó (20 hembras), el 65% de las hembras quedaron gestantes y el 35% no (Figura 3). Considerando la población en general (100%), se observó que del 50% inseminado utilizando Dimetilformamida con lipoproteínas como diluyente, sólo quedó gestante el 30%; del otro 50% en el que se utilizó a la Dimetilformamida con yema de huevo como diluyente, quedó gestante el 35% (Figura 4).

Cuando se inseminaron las conejas con semen adicionado con Dimetilformamida con LDL (lipoproteínas de baja densidad), se observó que al utilizar el semen del Belier, el 100% de las conejas quedó gestantes y cuando se utilizó semen del Nueva Zelanda sólo el 20% de las conejas quedó gestantes (Figura 5). Al utilizar como diluyente Dimetilformamida con yema de huevo, el semen de Belier permitió obtener nuevamente el 100% de hembras gestantes y el de Nueva Zelanda dejó gestantes sólo al 40% (Figura 5).

Cuando se comparó el desempeño de los diluyentes (Dimetilformamida con LDL vs Dimetilformamida con yema de huevo), independientemente de la raza, se observó que usando el primero, quedó gestante el 60% de las hembras y cuando se utilizó el segundo, el porcentaje de hembras se incrementó a 70% (Figura 6).

Cuando se comparó la inseminación de semen de Belier con semen de NZ, independientemente del diluyente utilizado, se observó que las hembras que se inseminaron con Belier, el 100% quedó gestante y las hembras que se inseminaron con semen de NZ, únicamente quedó gestante el 30% (Figura 7).

## DISCUSIÓN

Si bien la técnica de inseminación artificial (IA) en conejos se ha practicado en los países europeos desde los años 80 del siglo pasado, solo se ha llevado a cabo con la utilización de semen fresco, ya que la preservación por congelamiento ha resultado especialmente difícil (Moce y Vicente, 2009). La utilización exitosa de algunos extenders en varias especies animales no ha tenido el mismo impacto en la cunicultura; lo cual ha obligado a buscar alternativas y a realizar ajustes en las fórmulas utilizadas. Tomando en consideración la experiencia con el manejo y la preservación del semen de machos pertenecientes a otras especies (Batellier *et al*, 1997; Bergeron y Manjunath, 2006; Moustacas *et al*, 2011), en el presente trabajo se contrastó la utilidad de dos diluentes: dimetilformamida con lipoproteínas de baja densidad y dimetilformamida con yema de huevo, con las fórmulas ajustadas y ya especificadas dentro de la metodología, y el análisis estadístico nos muestra que no se observó diferencia significativa entre la proporción de hembras gestantes atribuible al diluyente del semen ( $P \geq 0.05$ ). Por ello podemos mencionar que ambos medios, y por lo tanto, ambas fórmulas, permitieron congelar y descongelar el semen de conejo y mantener su capacidad de fertilización, lo cual constituye un avance dentro de la preservación del semen de conejo durante tiempos mayores (4 meses) a los que generalmente se utilizan en nuestro país para practicar la IA. Cabe hacer notar que ambas fórmulas fueron ajustadas específicamente para los conejos y que son consecuencia de la experiencia con el manejo de semen de otras especies. Se observó que con la criopreservación de semen de conejo usando estos medios se obtuvieron tasas de fertilidad similares a las obtenidas por otros autores con otros crioprotectores; Hanada y Nagase 1980 obtuvieron con DMSO 93%, acetamida 88% y con lactamida 73%; Viudes-de-Castro y Vicente 1996 obtuvieron 79% con DMSO; Si W *et al* 2006 obtuvieron 73.9% con DMSO; Okuda *et al* 2007 con acetamida obtuvieron el 87.5% y en éste estudio cuando utilizamos Dimetilformamida con LDL obtuvimos 60% y utilizando Dimetilformamida con yema de huevo se obtuvo el 70% de fertilidad.

Es importante hacer notar que si bien el objetivo del presente trabajo fue comparar la utilidad de los dos diluentes ya mencionados, se observó un hallazgo al azar que indicaría un aparente efecto de raza; ya que el semen de Belier fue 100% efectivo al dejar gestantes a las conejas criollas y el semen de Nueva Zelanda Bco., solo fue 30% efectivo. Evidentemente la utilización de un solo macho de cada raza es insuficiente para afirmar que hay diferencias al respecto del impacto de la congelación sobre los espermatozoides. En este sentido solo se reporta como un hallazgo, pero valdría la pena realizar estudios posteriores específicos para dilucidar esta situación y saber si existe algún fundamento para suponerlo.

El usar sacarosa hace que la eficiencia de la IA con semen congelado alcance un buen nivel de fertilidad como el encontrado por varios autores (Viudes-de-Castro y Vicente 1996; Vicente y Viudes-de-Castro 1996). La sacarosa tiene la capacidad de actuar como un agente crioprotector no penetrante y es menos tóxico para los espermatozoides. La sacarosa estabiliza las membranas liposomales durante la congelación (Anchordoguy 1987). Además provee una fuente de energía para las células espermáticas, mantiene la presión osmótica del diluyente y actúa como crioprotector. Durante la congelación ocurren fenómenos de deshidratación celular. El medio externo de la célula como consecuencia de la congelación parcial y de la formación de cristales de hielo, posee una concentración de solutos mayor en la fracción líquida externa que antes de la formación de los cristales de hielo. Esto determina que el medio externo que rodea a la célula posea una mayor presión osmótica que el medio celular interno. En respuesta a los fenómenos ocurridos y a las diferencias fisicoquímicas entre el medio interno y externo el agua sale de la célula y se congela externamente. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela en su interior. Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cantidad de células dañadas por la cristalización (Stornelli MA, y de la Sota RL 2006).

Es importante hacer notar que uno de los objetivos de la aplicación de la técnica de inseminación artificial es la de estimular el mejoramiento genético, lo cual se podría

lograr si se puede preservar adecuadamente el semen a partir de conejos genéticamente superiores y después, trasladarlo y aplicarlo en conejas de granjas que deseen mejorar su hato; sin embargo, al respecto hay varias situaciones que no se han resuelto favorablemente dentro de la cunicultura nacional. En las granjas en las que se aplica, la técnica de IA sólo ha constituido una herramienta para facilitar el trabajo de inseminar grandes cantidades de reproductoras, pero sin propósitos genéticos específicos. Algunas de las empresas o instituciones que ofrecen este servicio, incluso inseminan con semen fresco (semen obtenido y preservado solo por 6-12 horas) utilizando un pool de semen de varios sementales. Cabe señalar que a nivel nacional tampoco se han realizado esfuerzos serios, a mediano y largo plazo, para la generación de pie de cría con características genéticas superiores de manera comprobada y solo algunas instituciones han realizado trabajos discretos. Si no existen conejos con características superiores, ¿cuál es la genética que interesa difundirse en las granjas? Es muy probable que la cunicultura mexicana en general aún no esté preparada para capitalizar al máximo las ventajas de la aplicación de la técnica de IA y que actualmente ésta se utiliza en algunas granjas más por comodidad y por moda, que por pretensiones específicas de mejoramiento genético.

En diversos estudios se menciona que el semen ovino es muy sensible, por tal razón al diluyente se le debe adicionar un protector de membrana, el cual asegura la viabilidad de las células espermáticas. Entre los protectores de membrana más utilizados está la yema de huevo, que debido a sus propiedades es el ingrediente de elección. Tanto la yema de huevo como la leche aportan, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas minimizando los efectos nocivos de los cambios de temperatura (Graham y Foote, 1987; Parks y Graham, 1992). Sin embargo, se ha observado que la porción de la yema de huevo que proporciona esta estabilidad de membrana son las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por esta razón, se ha propuesto utilizar únicamente a las LDL como parte del diluyente del semen, las cuales son el mayor constituyente de la yema de

huevo y se presume que son las responsables del efecto estabilizador y reparador de la membrana espermática. Moussa *et al*, (2002) observaron un incremento en la movilidad de los espermatozoides al aplicar LDL al diluyente como un protector de membrana. También Moustacas y col (2011) observaron que al aplicar LDL en semen ovino se mejoraba la movilidad espermática; probablemente esto contribuyó a que se obtuviera una mejor fertilidad ya que pasaron más eficientemente la barrera que representa el cérvix cuando se depositó el semen en las conejas.

## CONCLUSIONES

1. Se alcanzó el objetivo de criopreservar semen de conejo y mantener su viabilidad, comprobando su utilidad mediante la inseminación de conejas criollas y verificando su gestación.
2. Ambos diluentes utilizados (amidas con lipoproteínas de baja densidad y amidas con yema de huevo) permitieron la conservación del semen de conejo exitosamente
3. Se sugiere la realización de más estudios al respecto de la crioconservación del semen de conejo para aprovechar cabalmente la técnica de inseminación artificial como una verdadera alternativa dentro de la reproducción instrumental para estimular específicamente y de manera práctica la mejora genética de los hatos cunícolas.

## REFERENCIAS

1. ANCHORDOGUY TJ, RUDOLPH AS, CARPENTER JF, CROWE JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 1987; 24:324-331.
2. BAILEY JL, BILODEAU JF, CORMIER N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21:1-7.
3. BATELLIER F, MAGISTRINI M, FAUQUANT J, PALMER E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 48:391-410.
4. BERGERON A, MANJUNATH P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:1338-1344.
5. DALIMATA AM, GRAHAM JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology* 1997; 48:831-841.
6. EL-GAAFARY MN, MARAI IFM. Artificial Insemination in rabbits. 1 International conference on rabbit production in hot climates; 1994 sept 6-8; Cairo Egypt. *Egypt J rabbit Sci* 1994; 4 (2) 95-107.
7. FARGEAS E. Quelques resultats obtenus en insemination artificielle avec de la semence congelee. *Cuniculture* 1995; 22:103-106.
8. GRAHAM JK, FOOTE RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987; 24:42-52.
9. HANADA A, NAGASE H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fert* 1980; 60:247-252.
10. KASHIWAZAKI N, OKUDA Y, SEITA Y. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White rabbit spermatozoa. *J Reprod Devel* 2006; 52 (No. 4)511-516.

11. MAURER RR, STRANZINGER GF, PAUFLER SK. Embryonic development in rabbits after insemination with spermatozoa stored at 37.5 or - 196°C for various periods. *J Reprod Fert* 1976; 48:43-49.
12. MEDEIROS CMO, FORELL F, OLIVEIRA ATD AND RODRIGUES JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 2002; 57:327-344.
13. MOCE E, VICENTE JS. Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42:189-196.
14. MOCE E, VICENTE JS. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim Reprod Sci* 2009; 110:1-24.
15. MOUSSA M, MARTINET V, TRIMECHE A, TAINTURIER D, ANTON M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002; 57:1695-1706.
16. MOUSTACAS VS, ZAFFALON FG, LAGARES MA, LOAIZA-ECCHEVERRI AM, VARAGO FC, NEVES MM, HENEINE LGD, ARRUDA RP, HENRY M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2011; 75:300-307.
17. MORIYA, T. Cryopreservation of semen from Japanese white rabbits for use in theratological studies. *Exp Anim* 1996; 45:403-404.
18. OKUDA Y, SEITA Y, HISAMATSU S. Fertility of spermatozoa criopreserved with 2% acetamida or glycerol through artificial insemination in the Japanese White rabbit. *Exp Anim* 2007; 56 (No.1)29-34.
19. O'SHEA T, WALES RG. Further studies of the deep freezing of rabbit spermatozoa in reconstituted skim milk power. *Aust J Biol Sci* 1969; 22:709-719.
20. PARKS JE, GRAHAM JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38:209-222.
21. PARRISH JJ, FOOTE RH. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod* 1986; 35:253-257.
22. ROSATO MP, REBOLLAR PG, IAFFALDANO N. Comparación de diferentes diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su



conservación. Memorias de XXXI Symposium de cunicultura; 2006 Mayo; Lorca España. España: Asociación española de cunicultura, 2006:9-13.

23. SAWADA Y, CHANG MC. Motility and freezing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in medium containing dimethyl sulfoxide. Fertil. Steril 1964; 15:222-229.

24. SI W, HILDEBRANDT TB, REID C, KRIEG R, JI W. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. Theriogenology 2006; 65:788-798.

25. STRANZINGER GF, MAURER RR, PAUFLER SK. Fertility of frozen rabbit semen. J Reprod Fert 1971; 24:111-113.

26. STORNELLI MA, DE LA SOTA MA. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. Analecta Veterinaria 2006; 25:29-38

27. VICENTE JS, VIUDES-DE-CASTRO MP. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. Reprod Nutr Dev 1996; 36:485-492.

28. VIUDES-DE-CASTRO MP, VICENTE JS. A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. Anim Reprod Sci 1996; 44:195-201.

29. WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 2000; (60–61):481–492.

30. WEITZE KF, HELLEMANN C, KRAUSE D. Insemination with rabbit semen frozen in plastic straws. In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> international congress on animal reproduction AI. 1976; 2: 1100-1103.

31. YOSHIDA M. Conservation of sperms: current status and new trends. Anim Reprod Sci 2000; (60-61):349-355.

## CUADROS

**Cuadro 1**

**Características macroscópicas observadas en los eyaculados de conejos Belier y Nueva Zelanda.**

<b>Características macroscópicas</b>	<b>Nueva Zelanda</b>	<b>Belier</b>
Volumen	1 ml	1.5 ml
Color	Blanco nacarado	Blanco nacarado
Olor	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>

**Cuadro 2**

**Características microscópicas evaluadas en los eyaculados de conejos Belier y Nueva Zelanda.**

<b>Características microscópicas</b>	<b>Nueva Zelanda</b>	<b>Belier</b>
Movilidad	85 %	82.5 %
Concentración	265 millones/ ml	305 millones/ml
Morfología	Vivos normales: 80% Muertos: 5% Anormalidades <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primarias: 6%</li> <li>• Secundarias: 9%</li> </ul>	Vivos normales: 85% Muertos: 3% Anormalidades <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primarias: 5%</li> <li>• Secundarias: 7%</li> </ul>

**Cuadro 3**

**Resultados obtenidos en conejas inseminadas artificialmente con semen congelado, usando amidas con lipoproteínas de baja densidad y amidas con yema de huevo como diluyente.**

RAZA	DILUENTE (n=)		GESTANTES (n=)		GESTANTES (n=)	NO GESTANTE (n=)
	LDL	YEMA	LDL	YEMA		
<b>Belier</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
<b>Nueva Zelanda</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>

## FIGURAS

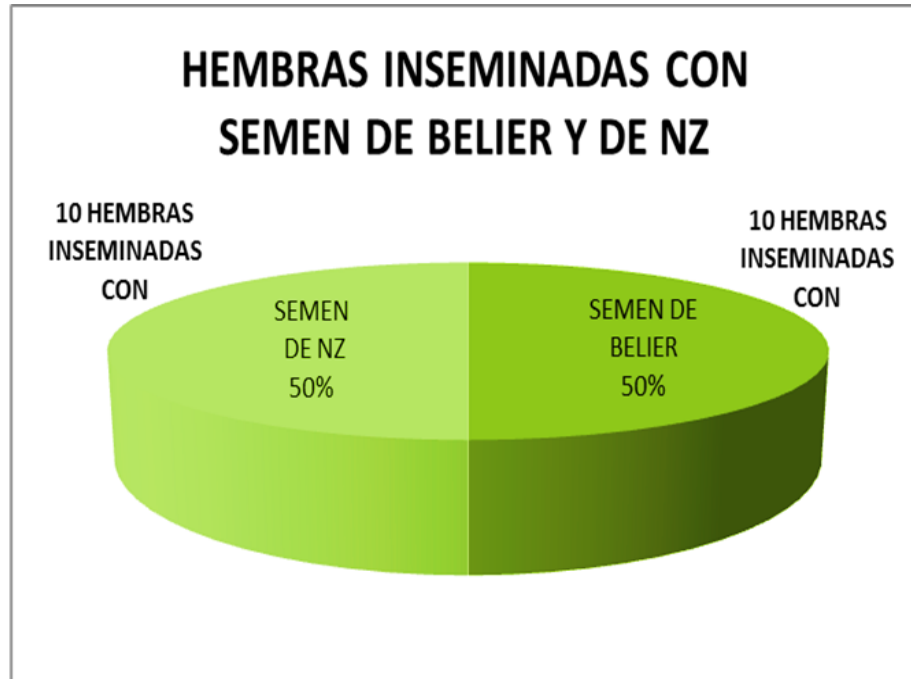


Figura 1. Número de conejas que se inseminaron con semen de conejo Belier y con semen de conejo Nueva Zelanda.



Figura 2. Número de hembras inseminadas con semen de conejo Belier o de Nueva Zelanda utilizando lipoproteínas o yema de huevo como diluyente.



Figura 3. Porcentaje de hembras gestantes y no gestantes en la población en general (20 hembras).

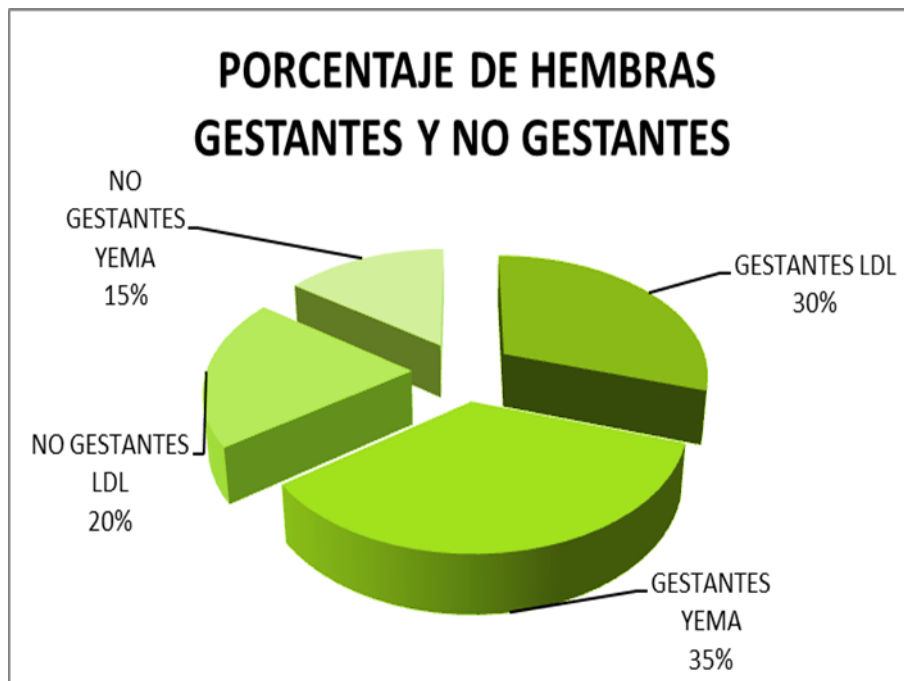


Figura 4. Porcentaje de hembras gestantes y no gestantes inseminadas artificialmente con semen congelado, usando amidas con lipoproteínas de baja densidad y amidas con yema de huevo como diluyente.

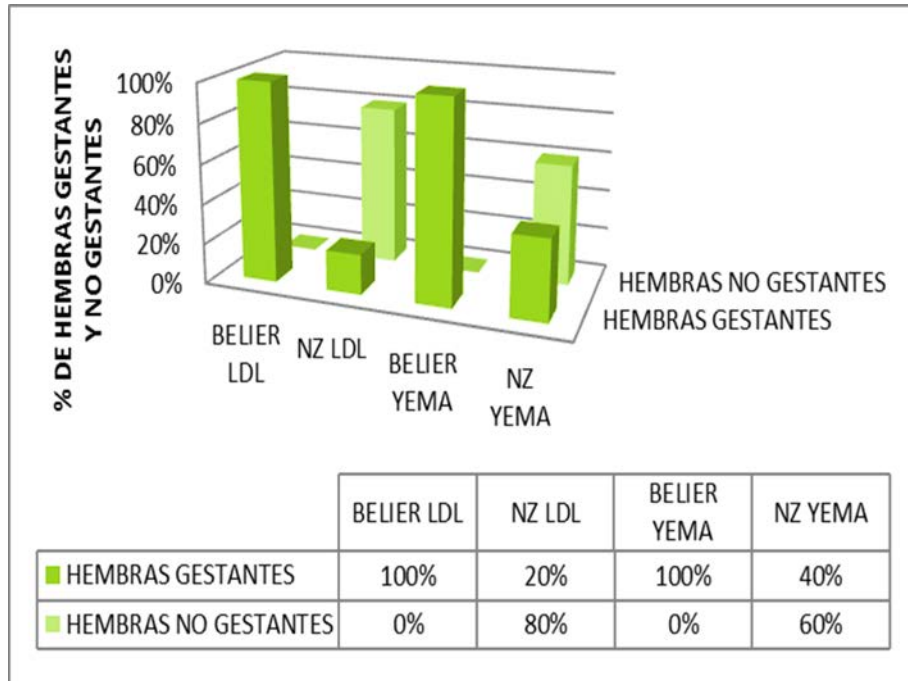


Figura 5. Porcentaje de hembras gestantes y no gestantes inseminadas artificialmente utilizando yema de huevo y lipoproteínas de baja densidad en semen de conejos Belier y Nueva Zelanda.

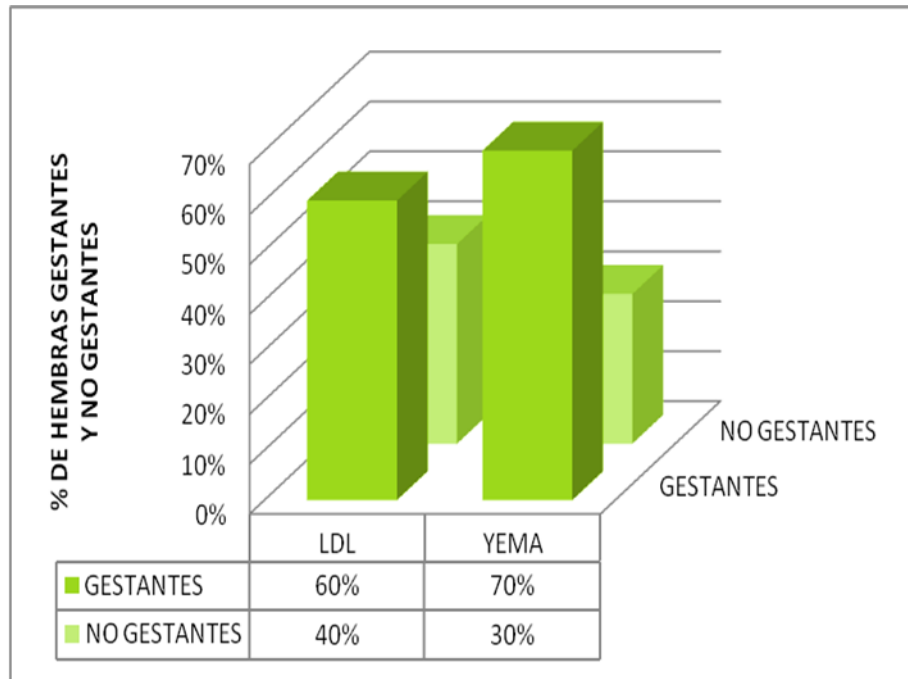


Figura 6. Porcentaje de hembras gestantes y no gestantes, independientemente de la raza, inseminadas con diferentes diluyentes (amidas con LDL vs amidas con yema de huevo).

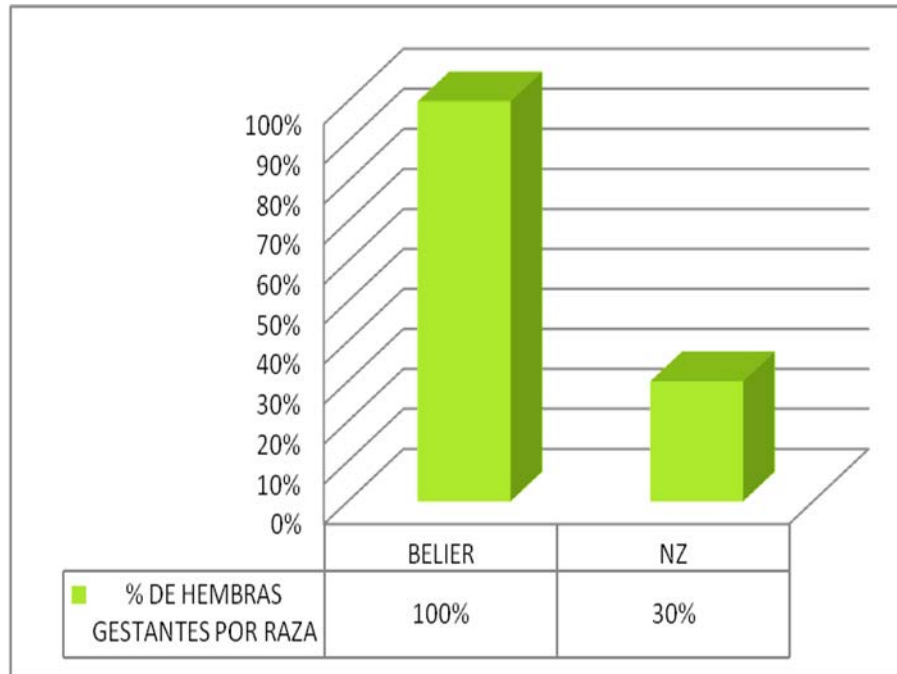


Figura 7. Porcentaje de hembras gestantes independientemente del diluyente, al inseminar con semen de Belier y semen de Nueva Zelanda.

## FOTOGRAFÍAS

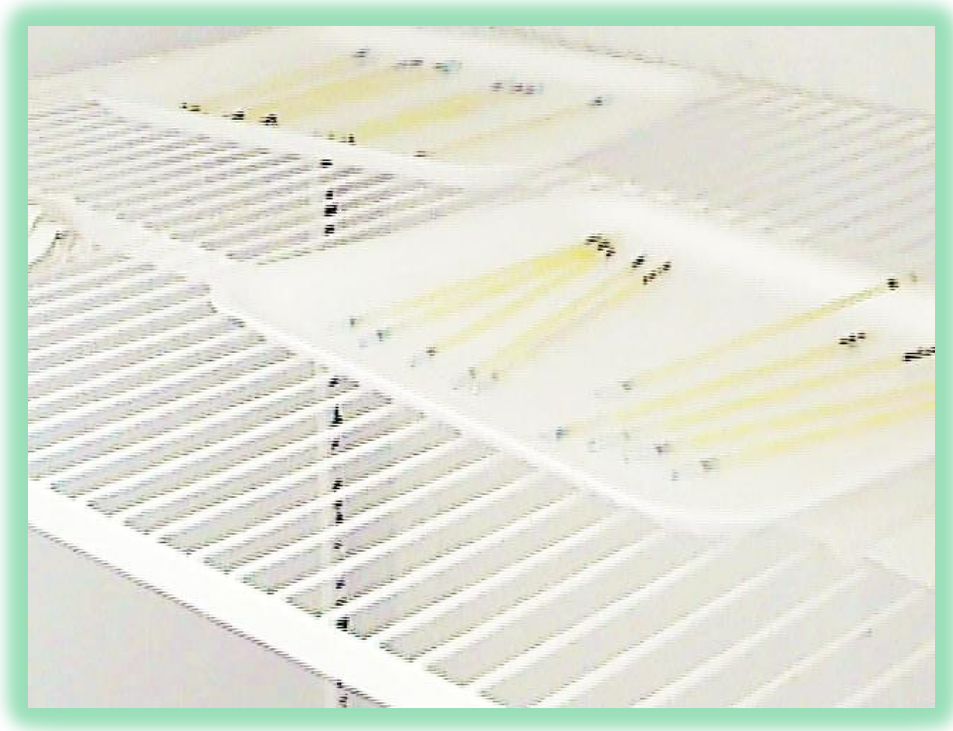


Fotografía 1. Muestras teñidas para evaluación de la morfología de los espermatozoides.



Fotografía 2. Muestras de semen obtenidas, mantenidas a 37°C.

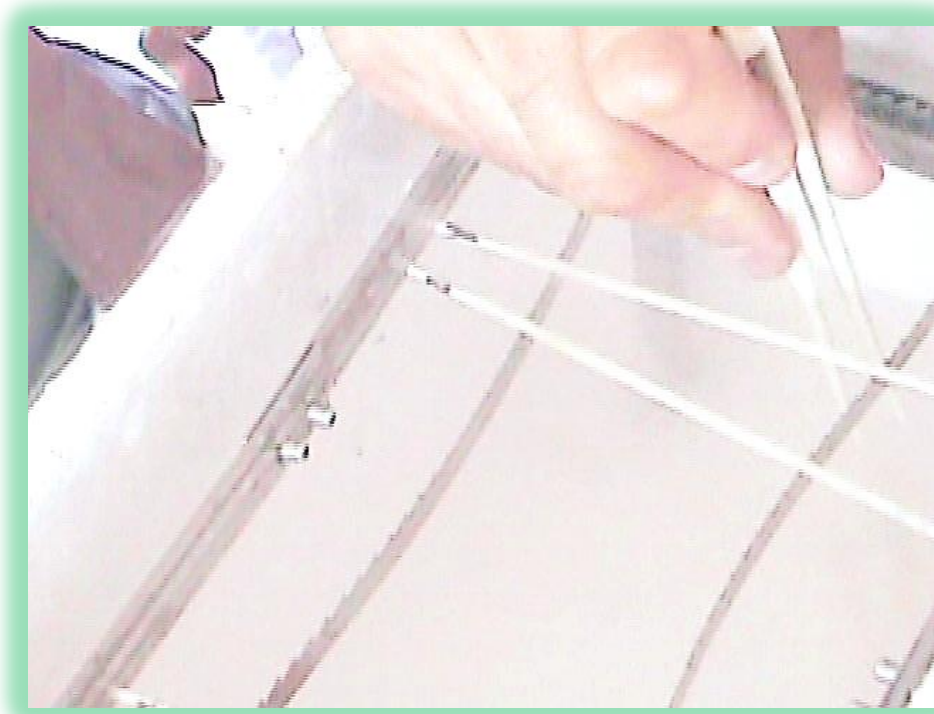




Fotografía 3. Conservación a 5°C/30 minutos de las pajillas preparadas.



Fotografía 4. Exposición de las pajillas a vapores de nitrógeno líquido (-80°C, por 15 minutos) a través de la utilización de una rejilla.



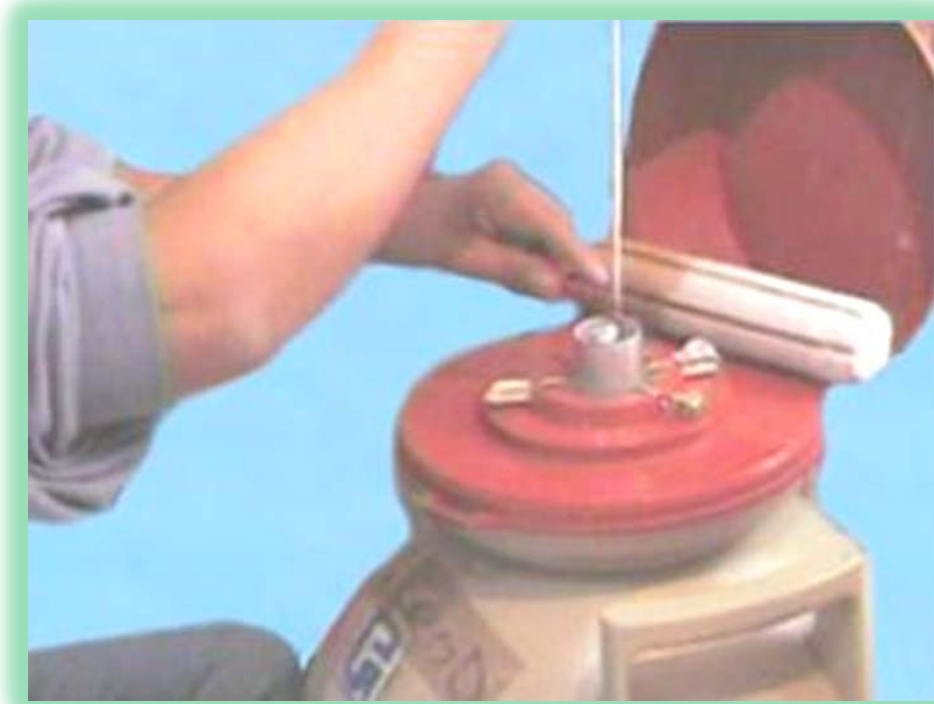
Fotografía 5. Pajillas sumergidas en nitrógeno líquido.



Fotografía 6. Extracción de las pajillas inmersas en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento en el tanque de transporte.

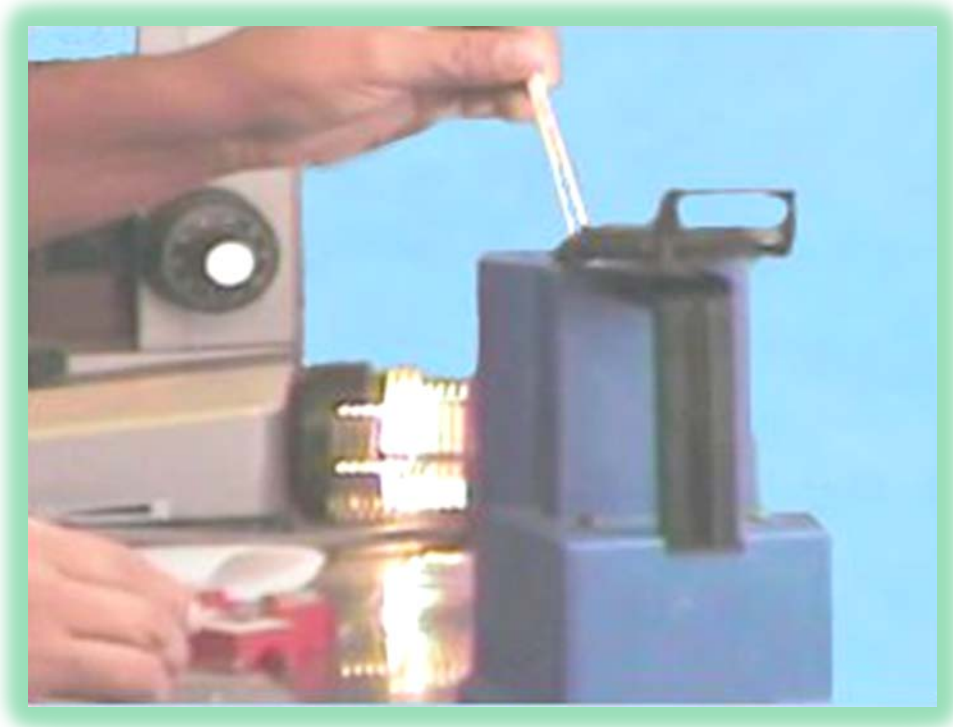


Fotografía 7. Almacenamiento de las pajillas dentro del tanque de nitrógeno líquido, para facilitar su desplazamiento y su utilización posterior.



Fotografía 8. Extracción de las pajillas transportadas para utilizarlas en la inseminación de las conejas.





Fotografía 9. Descongelamiento de las pajillas mediante la utilización de un “Baño María”.



Fotografía 10. Corte de un extremo de la pajilla para depositar el contenido en un recipiente.



Fotografía 11. Verificación de la viabilidad de los espermatozoides descongelados.



Fotografía 12. Hembra receptiva, sincronizada con Gonadotropina Coriónica equina.



Fotografía 13. Utilización de un catéter semirrígido, con punta curvada, para facilitar el depósito del semen en la vagina.



Fotografía 14. Introducción de la pajilla, con la curvatura hacia arriba, preparada adecuadamente para inseminar a la coneja.

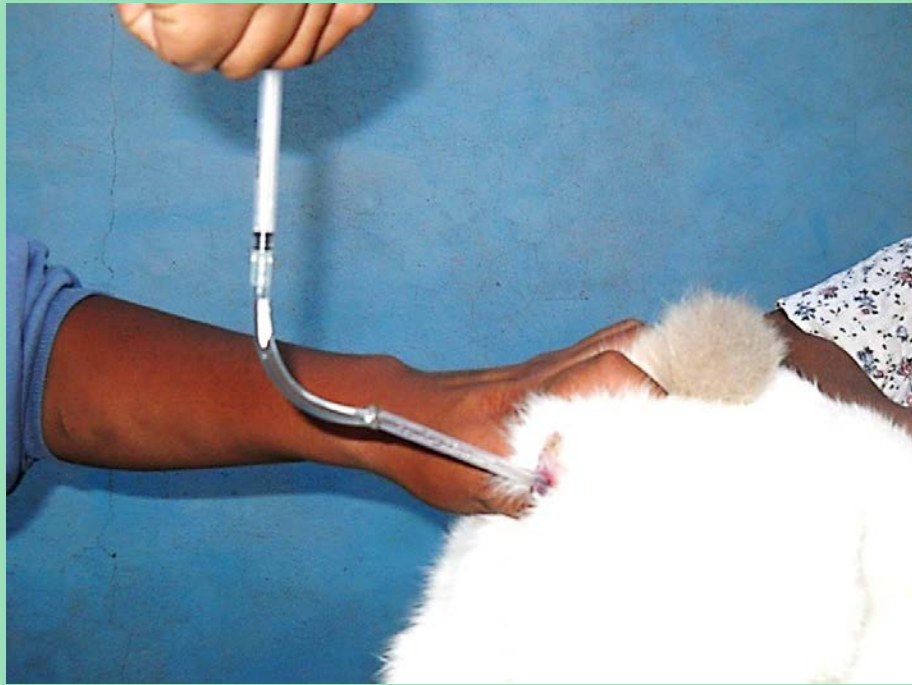


Fotografía 15. Introducción de la pajilla hasta el cinturón pélvico tenido como referencia.



Fotografía 16. Giro de 180° de la pajilla para permitir su avance.





Fotografía 17. Cuando se calculó que la pajilla estaba en el sitio apropiado dentro de la vagina (15-17 cm), se presionó gentilmente el émbolo de la jeringa para su vaciamiento.



Fotografía 18. Depósito del semen aproximadamente en la entrada de los cérvix.





Fotografía 19. Retiramiento de la pajilla vacía.



Fotografía 20. Utilización de Gonadorelina (análogo de GnRH) para estimular la ovulación.



Fotografía 21. Aplicación de Gonadorelina a razón de 20  $\mu$ g, por vía intramuscular.



Fotografía 22. Dosis de aplicación: dos pajillas por coneja.



Fotografía 23. Diagnóstico de gestación mediante palpación abdominal externa a los 14 días después de la inseminación.