



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

INFLUENCIA DE DOS DILUYENTES DE CORTA DURACIÓN EN LA
CALIDAD ESPERMÁTICA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN CONEJAS

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

VICENTE DE LA CRUZ CRUZ

Bajo la supervisión de: **Raymundo Rodríguez De Lara, Ph.D.**



Chapingo, Estado de México, julio de 2023



APROBADA

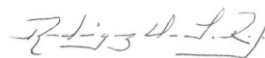


**INFLUENCIA DE DOS DILUYENTES DE CORTA DURACIÓN EN LA
CALIDAD ESPERMÁTICA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN CONEJAS**

Tesis realizada por **VICENTE DE LA CRUZ CRUZ**, bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph.D. Raymundo Rodríguez De Lara

ASESOR:



Dra. Marianella Fallas López

ASESOR:



Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde

ASESOR EXTERNO:



Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE apéndices.....	vii
ABREVIATURAS USADAS	viii
DEDICATORIA	x
AGRADECIMIENTOS.....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xiii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Fisiología de la reproducción del macho.....	6
2.1.1. Espermatogénesis.....	6
2.1.2. Semen y características seminales	7
2.1.3 Volumen	8
2.1.4 pH.....	8
2.1.5. Concentración espermática.....	8
2.2 Métodos de evaluación espermática	8
2.3 Diluyentes	9
2.4 Literatura citada	11
CAPÍTULO 3. INFLUENCIA DE DOS DILUYENTES DE CORTA DURACIÓN EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN CONEJAS.....	15
Resumen	15
ABSTRACT.....	16
3.1. Introducción	17
3.2 Materiales y métodos.....	18
3.2.1 Localización	18
3.2.2 Protocolos y diseños experimentales	18

3.2.3	Medio ambiente e instalaciones	20
3.2.4	Nutrición y alimentación	20
3.2.5	Manejo sanitario	20
3.2.6	Preparación de diluyentes de prueba.....	21
3.2.7	Protocolo de colección y análisis de semen.....	21
3.2.8	Bioestímulo y procedimientos de inseminación artificial en pruebas de campo.....	23
3.2.9	Variables de respuesta.....	23
3.2.10.	Análisis estadísticos	24
3.3	Resultados.....	25
3.4.	Discusión	34
3.6	Literatura citada.....	45
4.	APÉNDICES	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estadísticos descriptivos y coeficientes de variación para osmolaridad, calidad espermática y potencial reproductivo en conjugados seminales de conejos.	26
Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de raza, tipo de diluyente y tiempo de conservación en la osmolaridad, calidad espermática y potencial reproductivo en conjugados seminales de conejo.	27
Cuadro 3. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la osmolaridad y características de movilidad espermática en conejos.	29
Cuadro 4. Media de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de tipo de diluyente y tiempos de conservación en la receptividad sexual, fertilidad y prolificidad en conejas inseminadas artificialmente.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la osmolaridad del conjugado seminal de conejos.....	30
Figura 2. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en el porcentaje de espermatozoides estáticos en el conjugado seminal de conejos.	31
Figura 3. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la motilidad total espermática en el conjugado seminal de conejos.	31
Figura 4. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la motilidad progresiva espermática en el conjugado de semen de conejos.....	32

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Configuración del sistema CASA.	51
Apéndice 2 Configuración del sistema CASA para cinemática de movimiento espermático.	52

ABREVIATURAS USADAS

Abreviaturas	Significado
IA	Inseminación artificial
pH	Potencial de hidrógeno
<i>In vitro</i>	En vidrio
<i>In vivo</i>	En vivo
NZB	Nueva Zelanda Blanco
CA	California
mL	Mililitro
SBSF _E	Solución <i>buffer</i> salina fosfatada enriquecida
SBSF	Solución <i>buffer</i> salina fosfatada
CASA	Sistema de análisis de semen computarizado
cm	Centímetro
kg	Kilogramo
g	Gramo
mg/kg ⁻¹	Miligramos por kilogramo
g L ⁻¹	Gramo por litro
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
VSL	Velocidad rectilínea
VAP	Velocidad promedio de trayectoria

LIN	Índice de linealidad
STR	Índice de rectitud
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
M	Molar

DEDICATORIA

A todas las personas que creyeron en este proyecto, muchas gracias

A mi madre y mi familia que siempre me han apoyado

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios.

Al **Posgrado en Producción Animal (PPA)** de la Universidad Autónoma Chapingo por todo lo recibido.

Al **Centro de Investigación Científica del Estado de México (COCICEMAC)** y a todas las personas que ahí conocí por el apoyo incondicional para la realización de este trabajo de investigación.

Al Ph.D. **Raymundo Rodríguez de Lara**, por sus enseñanzas, entusiasmo, y por siempre estar al pendiente de mis estudios y experimento, gracias por permitirme entrar a su equipo de trabajo y por mostrarme el mundo de la cunicultura.

A la **Doctora Marianela Fallas López**, por el optimismo y disponibilidad para el desarrollo de esta investigación y de poner orden en el mismo, por su disposición y todo su apoyo.

De forma especial, al **Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde** por sus clases de cómo elaborar el proyecto de tesis y cómo hacer presentaciones me ayudaron mucho.

Al **Doctor Demetrio Ambriz**, por siempre apoyarme y ser un ejemplo desde la licenciatura, sin saberlo me orientó hacia el estudio de la Reproducción Animal, por siempre tener respuestas para todo.

A mis profesores en especial al **Ph.D. Rafael Núñez**, por el apoyo durante toda la Maestría, gracias a la **Ph.D. Teresa Sánchez** por sus enseñanzas en Reproducción Animal.

A mis compañeros y amigos de maestría que me ayudaron y motivaron (**Gris, Isra, Arturo, y Guadalupe**).

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales



Nombre	Vicente De La Cruz Cruz
Fecha de nacimiento	09 de diciembre de 1987
Lugar de nacimiento	Ixtlahuaca, Estado de México.
CURP	CUCV871209HMCRRRC07
Profesión	Licenciado en Producción Animal
Cédula Profesional	12311598
e-mail	v_delacruzacruz@hotmail.com

Desarrollo académico

Maestría en Ciencias (2021-2022)	Departamento de Zootecnia Posgrado en Producción Animal Universidad Autónoma Chapingo
Licenciatura (2014-2018)	Universidad Autónoma Metropolitana División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología reproductiva que consiste en la deposición de semen en el aparato reproductor de la hembra, a través de equipo instrumental, en el lugar y momento apropiado para la fecundación (Suarez, 2020).

El uso de la IA en conejos aplicada a granjas comerciales ofrece diferentes ventajas: disminuye significativamente el número de machos en la unidad de producción, reduce los tiempos de servicios, utiliza semen valorado por su calidad, mejora la planificación de las actividades de las granjas, facilita el manejo en bandas al reagrupar hembras en mismos estadios reproductivos, permite lograr partos contemporáneos, favorece la mejora genética al seleccionar machos superiores, reduce contagios de enfermedades y proporcionan las bases para la creación de centros de procesamiento y distribución de dosis seminales de alta calidad por lo que constituye una herramienta útil para incrementar la eficiencia económica de las granjas cunícolas (Alvariño, 1993; Constantini, 1989; Cruz & Tiparra, 2017; Jimenez & Vicente, 2023; Rodríguez-De Lara, 2002; Theau-Clément & Roustán, 1991; Tomas & Huerta, 2016).

En México, la IA se ha utilizado desde hace ya varios años y actualmente un gran número de granjas tecnificadas la utilizan, lo que ha contribuido a lograr un mayor desarrollo en la producción cunícola e incrementar la rentabilidad de esta actividad (Gomez, Herrera, Ortiz, Segura, & Becerril, 2011; Rodríguez-De Lara & Fallas, 1999).

En conejos, el semen una vez colectado mediante el uso de una vagina artificial y valorado mediante procedimientos convencionales y/o softwares especializados, aquellos ejemplares de buena calidad, son diluidos en medios de conservación apropiados para aumentar el volumen, mantener la viabilidad espermática y favorecer las condiciones óptimas para la fecundación (Morrel, 1995; Trejo, Meza, Antonio, Cotera, & Antonio-Cisneros, 2013). Carpio (2015), enfatiza que la utilización de diluyentes o extensores constituyen un aspecto

clave en el éxito de la IA, y definen al diluyente como una solución acuosa que permite incrementar el volumen seminal, y mejorar la viabilidad y estabilidad fisiológica de los espermatozoides hasta el momento de su utilización; además, proporciona los nutrientes suficientes para su metabolismo y los protege de agentes microbianos nocivos y variaciones en pH.

En conejos, el semen diluido en extensores en granja puede utilizarse como semen fresco o refrigerado y experimentalmente congelado o liofilizado (Tomas & Huerta, 2016). No obstante, el semen fresco diluido en medios de conservación adecuados y utilizado dentro de las primeras horas después de la colección es el que aporta los mejores resultados de comportamiento reproductivo comparado con refrigerado o congelado debido a la alta viabilidad espermática (Constantini, 1989; Rosato, Rebollar, & Laffaldano, 2006).

Las granjas tecnificadas que cuentan con sus propios machos y utilizan semen fresco, realizan la IA a las pocas horas después de la colección de semen, para lo cual, diluyen el semen en medios de conservación específicos que pueden ser aquellos comerciales empleados para refrigeración o basados en soluciones o *buffers* salinas fosfatadas (Alvariño, 1993; Lavara, Mocé, Lavara, Viudes de Castro, & Vicente. 2005; Rodríguez-De Lara & Fallas-López, 1999). Algunos estudios han demostrado que semen fresco de conejo diluido en medios apropiados de conservación y utilizado dentro de las 6 a 12 horas da resultados de fertilidad similares a los obtenidos con monta natural (Alabiso, Bonanno, Alicata, Leto, & Todaro, 1996).

Los diluyentes comerciales para semen de conejo con disponibilidad en el mercado internacional son: Lepus® (Medi Chimica, Italia), M III® (Mini-TUB, Alemania), Galap® (IVM Technologies, Francia), Cunigel® (IVM Technologies, Francia), algunos españoles como MRA-BIT® (KABUS S.A, España) y IA-873A® (INSERBO, España) (Domingo, Olaciregui, González, De Blas, & Gil 2019). Sin embargo, los productores en México que practican la IA están a expensas de adquirir diluyentes de importación a altos costos para obtener buenos resultados, razón por la cual se requiere desarrollar y validar diluyentes

locales eficaces de bajo costo que sin comprometer los parámetros productivos-reproductivos reduzcan los costos de inseminación.

En el **Capítulo 2** se presenta una revisión de literatura, donde se describen generalidades sobre fisiología de la reproducción en conejos machos, características seminales, métodos de evaluación seminal y diluyentes de conservación.

El **Capítulo 3** se presenta el artículo científico derivado de la fase experimental donde se discuten las características espermáticas y potenciales reproductivos.

Literatura citada

Alabiso, M., Bonanno, A., Alicata, M.L., Leto, G., & Todaro, M. (1996). Productivity of rabbit does subjected to artificial insemination and natural mating. *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress*, 2, 29-32.

Alvariño, M. R. (1993). Control de la Reproducción en el Conejo, España: Mundi Prensa. Primera edición, Madrid, España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación –IRYDA. 137 p. <https://www.mundiprensa.mx/catalogo/9788471144485/control-de-la-reproduccion-en-el-conejo>.

Carpio, C. S. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador].

Constantini, D. (1989). Inseminación artificial: sistemas de conservación de esperma. *Cuniculture*, 86,100-103.

Cruz, C., & Tiparra R. J. I. (2017) *Inseminación artificial en reproducción de conejos criollos* [Tesis Profesional. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.]

Domingo, P., Olaciregui, M., González, N., De Blas, I., & Gil, L. (2019). Effect of glycerol, n, n-dimethylformamide and n-methyl-2-pyrrolidone on rabbit sperm stored at 4 °C and 16 °C. *Animal Reproduction*, 16(4), 887–894. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0100>.

Gomez-Ramos, B., Ortiz-Rodríguez, R., Becerril-Pérez, C., Román-Bravo, R., & Herrera Camacho, J. (2011). Caracterización de la

producción de leche de la coneja con énfasis en la supervivencia y crecimiento de la camada en razas Nueva Zelanda Blanco y California. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1), 15-33. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915703002>

Jimenez, F. M., & Vicente, J. S. (2023). Reproductive performance of female rabbits inseminated with extenders supplemented with GnRH analogue entrapped in chitosan-based nanoparticles. *Animals*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/ani13101628>

Lavara, R., Mocé E., Lavara F., Viudes de Castro M. P., & Vicente J. S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64, 1130–1141.

Morrell, J. M. (1995). Artificial insemination in rabbits. *The British Veterinary Journal*, 151(5), 477–488. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80022-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80022-3)

Rodríguez-De Lara R. (2002). Control de la reproducción en la coneja. *Segundo Congreso de las Américas*, 19 al 22 de junio 2002, La Habana Cuba, 247-258.

Rodríguez-De Lara, R., & Fallas-López, M. 1999. Environmental and physiological factors influencing kindling rates and litter size at birth in artificially inseminated doe rabbits. *World Rabbit Science*, 7, 191-196.

Rosato, M. P., Rebollar, P. G., Laffaldano, N. (2006). Comparación de diferentes diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su conservación. *XXXI Symposiun de Cunicultura*, Lorca, España, 9-13.

Suarez, C. (2020). Evaluación de diluyentes para la refrigeración de semen de conejo (*oryctolagus cuniculus*) y su efecto sobre la calidad y la fertilidad espermática. (tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia). <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/78398/TESIS%20FINAL%20CAMILA%20SU%C3%81REZ%20.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

Theau-Clément, M., & Roustan, A. (1991). L'insemination artificielle chez la lapine. *El & Ins*, 245, 3-12.

Tomas, P. D., & Huerta, L. G. (2016). Preservación seminal: estado actual en la especie cunícola. *Boletín de Cunicultura* No. 180, 40-45.

Trejo, C., Meza, V., Antonio E., Coterá R., & Antonio-Cisneros, C. (2013). Agua de coco (*Cocus nucifera*) como diluyente para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Archivos de Zootecnia*, 62(238), 299-302.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

El conejo es un animal dócil y de fácil manejo, valioso para la alimentación humana por el alto valor nutritivo de su carne, se aprovechan su piel y pelo, además de que constituye una especie que ha sido empleada como modelo animal por su similitud con humanos en investigaciones sobre fisiología cardiovascular, producción de anticuerpos y metabolismo de lípidos que han contribuido a comprender mejor algunas enfermedades como la aterosclerosis y la hipercolesterinemia (Nishijima et al., 2021).

2.1 Fisiología de la reproducción del macho

Los testículos son glándulas muy importantes en la reproducción, tienen dos funciones principales: una exocrina, que está implicada en la producción espermática y otra endocrina, que se encarga de la producción de esteroides, que es realizada por las células de Leydig, las cuales se sitúan en el compartimento intersticial, fuera de los túbulos seminíferos (Staub & Johnson, 2018). Por otra parte, los testículos del conejo descienden al escroto antes de la pubertad, que generalmente inicia a partir de los cinco meses. En el caso de conejos de raza Nueva Zelanda Blanco, la mitosis de espermatogonias se produce a los dos meses de edad, y la maduración de los espermatozoides entre 13 y 14 semanas posteriores (Mahmoud et al., 2020).

2.1.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo pero ordenado (Park et al., 2022) de multiplicación y diferenciación celular, cuyo fin es la producción de espermatozoides. La espermatogénesis se divide en: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis (Staub & Johnson, 2018). Durante la espermatogénesis, las células madre espermatogoniales producen espermatogonias que se convertirán en espermatocitos luego en espermátidas y como producto final espermatozoides maduros (Ni, Hao & Yang, 2019). En esta última etapa la célula germinal masculina adquiere su forma final, luego de una diferenciación celular. La espermatogénesis en el conejo dura

aproximadamente 49 días y se estima una producción de espermatozoides de entre 30 a 40 millones por gramo de testículo al día, presentando variaciones entre razas y estaciones climáticas (Lavara, 2009). La espermatogénesis está regulada por el eje hipotálamo hipófisis gonadal y por secreciones de testosterona de las células de Leydig (Samano, 2021).

Una vez que los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero, deberán viajar a través de los ductos eferentes hasta el epidídimo. Sin embargo, hasta este momento, los espermatozoides no son capaces de fertilizar al ovocito, por lo que necesitan completar los posteriores cambios estructurales, fisiológicos y bioquímicos durante su paso por el túbulo epididimario para adquirir esta capacidad (Samano, 2021).

2.1.2. Semen y características seminales

Se considera que el eyaculado de los conejos es bifásico, es decir, se compone de dos fracciones, una de ellas es de aspecto traslúcido, que contiene gotas de grasa, a la que le denomina tapón mucoso o gel y que es necesario retirar antes de la evaluación seminal, porque aglutina a los espermatozoides. La otra fracción se compone del líquido seminal y espermatozoides (Alvariño, 1993).

En el conejo el semen es un líquido de aspecto blanquecino y traslúcido que contiene sustancias orgánicas e inorgánicas. Entre las orgánicas se encuentran: inositol, fosfolípidos, prostaglandinas, proteínas, fructosa (0.4-4 mg/ml) ácido cítrico (0.5-6 mg/ml), mismos que juegan un rol importante en el mantenimiento de la presión osmótica, control de pH, además de que son fundamentales en la regulación del metabolismo, sobrevivencia y transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra (Castellini et al., 2022). Por su parte, los elementos inorgánicos del semen están constituidos por sodio, potasio y cloro los cuales funcionan como agentes protectores y nutren a los espermatozoides.

2.1.3 Volumen

Puede presentar variaciones entre razas, estación del año, edad de los sementales, sistema de crianza y alimentación. El volumen deseable será entre 0.1 a 1.4 mL (Ferrian, 2007).

2.1.4 pH

El rango deseable es de 6.8 a 7.3, por lo que valores distintos a estos serían de un semen de baja calidad (Arzate, 2019).

2.1.5. Concentración espermática

Esta variable hace referencia a la cantidad de espermatozoides que hay en un mililitro de semen. Algunos autores (Arzate, 2019; Ferrian, 2007) reportaron que este valor puede variar entre 280 y hasta 1050 millones espermatozoides por mL, mientras que Hernández (2016) reporta que puede variar de 50 y hasta 500 millones de espermatozoides por mL.

2.2 Métodos de evaluación espermática

Los sistemas de análisis de semen computarizados han evolucionado desde hace más de 40 años y surgen por el interés de conocer el movimiento y forma espermática para evaluar de forma automática, pronta y precisa estas muestras biológicas, reduciendo con ello las estimaciones visuales subjetivas tradicionales (Van de Hoek, Rickard, & De Graaf, 2022).

La motilidad de los espermatozoides es un parámetro fundamental en la evaluación de la calidad espermática. La baja motilidad se asocia a tasas de fertilización deficientes (Van de Hoek et al., 2022) definieron la motilidad espermática como la propagación de ondas de forma transversal a través del flagelo, desde luego que esto produce un estímulo que impulsa al espermatozoide de manera progresiva por el tracto reproductivo femenino.

Por otro lado, el acrónimo CASA, se refiere al análisis de espermatozoides, asistido por computadora (Amann & Waberski, 2014), y consiste en un sistema (hardware y software) que de forma automatizada permite visualizar, y procesar información para obtener datos objetivos sobre la cinemática de los espermatozoides (Amann & Katz, 2004).

El sistema de evaluación seminal CASA captura fotogramas, mismos que se digitalizan para identificar las trayectorias y se procesan matemáticamente, lo que permite obtener datos numéricos que se relacionan con parámetros que indican el movimiento preciso de cada espermatozoide (Křížková, Čoudková, & Maršálek, 2017). Debido a esto, el sistema CASA, proporciona una evaluación objetiva de la motilidad espermática y además considera varios parámetros de motilidad adicional como la velocidad curvilínea, la velocidad promedio de la trayectoria y la frecuencia cruzada de batido. Además, el sistema CASA resulta fundamental para obtener datos importantes sobre la calidad espermática y para estudiar los efectos de cambios en características del movimiento de los espermatozoides *in vitro* posibilitando la proyección de estas variables *in vivo*.

Otros aspectos deseables de evaluación son por ejemplo la integridad acrosomal, la cual es importante para la penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida durante la fecundación, así como la morfología de los espermatozoides debido a se ha estudiado que existe una correlación entre las anomalías espermáticas y la disminución de la fertilidad (Lavara, Mocé, Lavara, Viudes de Castro, & Vicente, 2005).

2.3 Diluyentes

Un diluyente es un medio protector que determina la eficiencia de los programas de inseminación artificial, criopreservación o manejo seminal. Actualmente existen diluyentes naturales y diluyentes comerciales, la mayoría de los centros de IA emplean diluyentes comerciales, debido a su practicidad y eficacia la cual es mayor (Abdel-Aziz et al., 2019).

Los diluyentes actuales han ido mejorando gracias a la necesidad de conservar la supervivencia espermática, y se han superado muchos obstáculos, por ejemplo: daños a la membrana espermática, choques térmicos, toxicidad de los reactivos, cambios de pH y las fuentes alternas de energía para los espermatozoides, actualmente muchos diluyentes incluyen en su composición elementos de origen animal, por ejemplo: leche descremada, yema de huevo o de origen vegetal como lecitina de soya, debido a que protegen como

sustancias no penetrantes, aunque éstos se utilizan preferentemente en los métodos de criopreservación (Bustani & Baiee, 2021).

Otros ingredientes que constituyen los diluyentes como fuente de energía, son azúcares como glucosa y fructosa, que son las principales fuentes energéticas (Bustani & Baiee, 2021). Además, contienen un agente tamponado como el Tris (hidroximetil) aminometano, que ayuda a mantener el pH estable (Kamal, Alam, Islam, Gofur, & Kabir, 2022). A los diluyentes también se les agregan antibióticos, como estreptomina, penicilina, y gentamicina, para contender con la contaminación bacteriana. Otro ingrediente importante es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como quelante de calcio (Keshtgar, Iravanpour, Gharezi-Fard, & Kazerooni, 2016). Allai, Benmoula, Marciane da Silva, Nasser y El Amiri (2018) sostienen que la adición de gelatina a los diluyentes de semen para carnero al 0.5 %, aumenta la densidad (gelificación) y mejora la calidad del semen, la supervivencia y capacidad de penetración de los espermatozoides in vitro comparándolo con el diluyente líquido de densidad normal. Este mismo autor, argumenta que la inclusión de gelatina evita que los espermatozoides se sedimenten en el fondo de la muestra, permitiendo que estos se distribuyan de manera uniforme, minimizando los efectos dañinos del pH y productos metabólicos tóxicos. Por su parte, Nagy, Sinkovics y Kovács (2002) observaron que la adición de un gramo de gelatina al semen de conejo mejora significativamente los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto, después del almacenamiento a corto plazo, y sugirieron que la gelatina evita que los espermatozoides se sedimentaran, además de que el pH de los espermatozoides se mantiene más bajo en las zonas de sedimentación en donde puede haber productos metabólicos tóxicos. Se ha demostrado que, en semen de conejo y carnero, la adición de gelatina protege la viabilidad de espermatozoides durante periodos de almacenamiento prolongado (Gheller et al., 2018).

2.4 Literatura citada

- Abdel-Aziz Swelum, M. S., Ba-Awadh, H., Al-Mutary, M., Moumen, A., Alowaimer, A., & Abdalla, H. (2019). Efficiency of commercial egg yolk-free and egg yolk-supplemented tris-based extenders for dromedary camel semen cryopreservation. *Animals*, 9(11), 999. <https://doi.org/10.3390/ani9110999>
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>
- Alvariño, M. R. (1993). Control de la Reproducción en el Conejo, España: Mundi Prensa. Primera edición, Madrid, España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación –IRYDA. 137 p. <https://www.mundiprensa.mx/catalogo/9788471144485/control-de-la-reproduccion-en-el-conejo>.
- Amann, R., & Katz, D. F. (2004). Andrology lab corner: Reflections on casa after 25 years. *Journal of Andrology*, 25(3), 317-325.
- Amann, R., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5–17. E3. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Arzate, M. (2019). *Comportamiento sexual y calidad seminal de tres genotipos de conejo durante el otoño*. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Estado de México.). <https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/5c305d25-8ac9-496f-a6b9-6a34a5abd9f5>.
- Bustani, G., & Baiee, F. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
- Castellini, C., Mattioli, S., Cotozzolo, E., Pistilli, A., Rende, M., Bartolini, D., Di Sante, G., Menchetti, L., Dal Bosco, A., & Stabile, A. M. (2022). The effect of interaction NGF/p75NTR in sperm cells: A rabbit model. *Cells*, 11(6), 1035. <https://doi.org/10.3390/cells11061035>
- Ferrian, S. (2007). *Características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación*. (Tesis de Maestría, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España).

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12203/Tesis%20MPA%20Selena%20Ferrian.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Gheller, S., Corcini, C., Pradieé, J., Rizzoto, G., Lucia, T., Moreira, F., & Varela Junior, A. (2018). Gelatin protects ram semen stored for 72 h at 5 °C. *Small Ruminant Research*, 158, 54–56. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.09.011.
- Hernández, M. (2016). *Comparación de la conservación in vitro y capacidad fertilizante in vivo del semen de conejo refrigerado con dos diluyentes*. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, CDMX.]. <http://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/v692t621m>.
- Kamal, M., Alam, M., Islam, M., Gofur, M., & Kabir, A. (2022). Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane and egg yolk on the cryopreservation of buck semen. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 9(4), 676–683. <https://doi.org/10.5455/javar.2022.i636>
- Keshtgar, S., Iravanpour, F., Gharezi-Fard, B., & Kazerooni, M. (2016). Combined effect of Trolox and EDTA on frozen-thawed sperm quality. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(3), 230–237.
- Křížková, J., Čoudková, V., & Maršálek, M. (2017). Computer-assisted sperm analysis of head morphometry and kinematic parameters in Warmblood stallions spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary*, 57, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.012>
- Lavara, R. (2009). *Estimación de los parámetros genéticos de producción y calidad seminal en una línea paternal de conejos*. (Tesis de Maestría, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España). <https://riunet.upv.es/handle/10251/12908>.
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64(5), 1130–1141. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.009>
- Mahmoud, S., Saad, M., El-Shehawi, A. M., Farrag, F., Abo Ghanima, M. M., Dawood, M. A. O., & Shukry, M. (2020). Promoting effect of L-tyrosine supplement on New Zealand rabbit bucks' performance and reproduction through upregulation of steroidogenic markers. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 605. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00605>
- Nagy, S., Sinkovics, G., & Kovács, A. (2002). Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-

- supplemented extender. *Animal Reproduction Science*, 70(3-4), 283–286. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00189-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00189-0)
- Ni, F., Hao, S, L., & Yang, W. (2019). Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell Death & Disease*, 10(8), 541. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1782-z>
- Nishijima, K., Kitajima, S., Matsuhisa, F., Niimi, M., Wang, C., & Fan, J. (2021). Strategies for highly efficient rabbit sperm cryopreservation. *Animals*, 11(5), 1220. <https://doi.org/10.3390/ani11051220>.
- Park, J., Kim, Y., Lee, S., Ko, J., Kim, D., & Lee, J. (2022). Down-regulation of neogenin decreases proliferation and differentiation of spermatogonia during the early phase of spermatogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14761. <https://doi.org/10.3390/ijms232314761>
- Samano, G.A. (2021) Marcadores apoptóticos en espermatozoides epididimarios durante el almacenamiento prolongado en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, CDMX.) <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=23556&docs=UAMII23556.pdf>
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 12(s1), s27–s35. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>
- Van de Hoek, M., Rickard, J. P., & de Graaf, S. P. (2022). Motility assessment of ram spermatozoa. *Biology*, 11(12), 1715. <https://doi.org/10.3390/biology11121715>

Este capítulo fue preparado para ser enviado a la revista *World Rabbit Science*

**CAPÍTULO 3. INFLUENCIA DE DOS DILUYENTES DE CORTA DURACIÓN
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN
CONEJAS**

Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia, Universidad
Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México – Texcoco. Chapingo, Estado
de México. México. C.P. 56230

CAPÍTULO 3. INFLUENCIA DE DOS DILUYENTES DE CORTA DURACIÓN EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN CONEJAS

Resumen

El objetivo fue evaluar la calidad espermática de conjugados seminales de conejos Nueva Zelanda Blanco (NZB) y California (CA) a las horas 0, 1 y 2 de conservación, en respuesta a diluciones con una solución *buffer* salina fosfatada estándar adicionada con gel (SBSF+ Gel), y la misma fórmula, pero enriquecida (SBSF_E + Gel). Se conformaron cuatro tratamientos experimentales como sigue: 1) semen de NZB diluido en SBSF_E + Gel; 2) semen de NZB diluido en SBSF + Gel; 3) semen de CA diluido en SBSF_E + Gel; y 4) semen de CA diluido en SBSF + Gel. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos y ocho repeticiones por tratamiento, donde la unidad experimental fue una gradilla. Una gradilla estuvo constituida de dos tubos de dilución. El número de muestras evaluadas fue 125. La dilución de conjugados con SBSF + Gel comparados con SBSF_E + Gel, mejoraron ($p<0.001$) la calidad espermática como resultado de -32.9% de espermias estáticos, e incrementos en motilidad total (+3.1 %), motilidad progresiva (+27.4 %), velocidad rectilínea (VSL; +6.4%), índice de linealidad (LIN; +18.9 %), espermias vivos normales mótils progresivos (EVNMP) y número de dosis para inseminación artificial (+24.5 %). Los conjugados diluidos de NZB comparados con CA, mejoraron ($p<0.0001$) la calidad espermática como resultado de -55.8 % espermias estáticos, e incrementos en normalidad morfológica (+1.6 %), motilidad total (+4.9%), motilidad progresiva (+48.1 %), VSL (+22.4), LIN (+19.7 %), EVNMP y dosis (+45.4 %). Se encontró un efecto de interacción ($p<0.02$) tipo de diluyente*raza para osmolaridad, espermias estáticos, y motilidad total y progresiva. La hora de conservación afectó ($p<0.005$) ocho de las variables de estudio, en donde la calidad espermática disminuyó con el tiempo. Los efectos de tipo de diluyente y hora de conservación en la fertilidad y prolificidad de conejos NZB son discutidos. Las diferencias en presiones osmóticas de los diluyentes probados explican los cambios en la calidad espermática entre diluyentes.

Palabras clave: conjugado seminal, conservación, raza, inseminación artificial, conejos.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Vicente De La Cruz Cruz

Director: Raymundo Rodríguez De Lara

ABSTRACT

INFLUENCE OF TWO SHORT-TERM EXTENDERS ON SPERM QUALITY AND REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN RABBITS¹

The objective was to evaluate the sperm quality of seminal conjugates from New Zealand White (NZB) and California (CA) rabbits at 0, 1, and 2 hours of conservation in response to dilutions with a standard phosphate buffered saline solution added with Gel (SBSF+ Gel) and the same formula but enriched (SBSF_E + Gel). Four experimental treatments were set up as follows: 1) NZB semen diluted in SBSF_E + Gel; 2) NZB semen diluted in SBSF + Gel; 3) CA semen diluted in SBSF_E + Gel; and 4) CA semen diluted in SBSF + Gel. The experimental design was completely randomized, with four treatments and eight replicates per treatment, where the experimental unit was a rack. One rack consisted of two dilution or preservation tubes. The number of samples evaluated was 125. The dilution of conjugates with SBSF + Gel compared to SBSF_E + Gel improved ($p<0.001$) the sperm quality because of -32.9% static sperm, and increases in total motility (+3.1%), progressive motility (+27.4%), rectilinear velocity (VSL) (+6.4%), linearity index (LIN) (+18.9%), progressive motile normal live sperm (EVNMP) and the number of doses for artificial insemination (+24.5%). Diluted NZB conjugates compared with CA, improved ($p<0.0001$) sperm quality as the result of -55.8% static sperm, and increases in normality morphological (+1.6%), total motility (+4.9%), progressive motility (+48.1%), VSL (+22.4), LIN (+19.7%), EVNMP and dose (+45.4%). An interaction effect ($p<0.02$) diluent type*breed was found for osmolarity, static sperm, and total and progressive motility. Time of storage affected ($p<0.005$) eight of the study variables where sperm quality decreased with time. The effects of diluent type and time of storage on fertility and prolificacy in NZB rabbits were determined. Differences in the osmotic pressures of the tested extenders explain the changes in sperm among extenders.

Keywords: seminal conjugate, conservation, breed, artificial insemination, rabbits.

¹ Master of Science Thesis in Livestock Innovation, Graduate Program in Animal Production, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Vicente De La Cruz Cruz
Advisor: Raymundo Rodríguez De Lara

3.1. Introducción

Uno de los factores que afecta el éxito en programas de inseminación artificial en conejos y otras especies, concierne al manejo de tecnologías de conservación y dilución del semen (Soliman & El-Sabrout, 2020), incluso se ha observado que los factores relacionados a las temperaturas, concentraciones de solutos y composiciones químicas de los diluyentes, afectan la calidad de los espermatozoides y su sobrevivencia durante el proceso de conservación (Rizkallah, Chambers, de Graaf, & Rickard, 2022). El procesamiento de células espermáticas utilizando diluyentes adecuados constituye un punto clave para obtener niveles de fertilidad elevados (Mara et al., 2007).

El semen fresco de conejo diluido en medios de conservación adecuados y utilizado dentro de las primeras horas después de la colección, es el que aporta los mejores resultados de comportamiento reproductivo comparado con métodos de refrigeración o congelamiento, debido a la alta viabilidad espermática (Constantini, 1989; Rosato, Rebollar, & Laffaldano, 2006). Las granjas tecnificadas que cuentan con sus propios machos y utilizan semen fresco, realizan la inseminación artificial (IA) a las pocas horas después de la colección de semen. Para su uso requiere la dilución del semen en medios de conservación específicos, que pueden ser aquellos comerciales empleados para refrigeración o basados en soluciones o *buffers* salinas fosfatadas (Alvariño, 1993; Lavara, Mocé, Lavara, Viudes de Castro, & Vicente, 2005; Rodríguez-De Lara & Fallas-López, 1999).

El uso de soluciones *buffers* salinas fosfatadas disponibles en el mercado internacional como diluyentes para la conservación de semen de conejo en fresco no está muy generalizado, pero en varios estudios se han reportado resultados satisfactorios de eficiencia reproductiva cuando el semen es diluido en este medio a 32 °C, y utilizado dentro de la primera hora después de la colección del semen (Rodríguez-De Lara, 1996; Rodríguez-De Lara & Fallas-López, 1999; Rodríguez-De Lara et al., 2007). Sin embargo, los costos de estos diluyentes de importación son altos. Por ejemplo, los precios actuales de algunos diluyentes comerciales (Cunigel y Galap) en la presentación de un litro

son \$4,159 y \$3,241 respectivamente, si se adquieren en ARBiotech en Sinaloa, México. En “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A.C. (COCICEMAC), desde hace varios años se han desarrollado diferentes medios de conservación de corta duración y bajo costo para uso en IA en nuestro país, basados en soluciones *buffers* salinas fosfatadas que varían en sus concentraciones de solutos (Velasco & Tello, 2019), pero que requieren ser validados.

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* la calidad espermática de conejos Nueva Zelanda Blanco y California a las horas 0, 1 y 2 de conservación a 32 °C, en respuesta a dos diluyentes de corta duración desarrollados localmente para uso como semen fresco de conejo. Además, se consideró evaluar los efectos del tipo de diluyente y tiempos de conservación en la fertilidad y prolificidad de conejas inseminadas artificialmente.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Localización

El estudio se realizó de marzo a octubre de 2022, en las instalaciones de “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A.C. (COCICEMAC), ubicado en San Miguel Coatlinchán, Estado de México, con coordenadas 19° 27' N, 98° 53' O y 2220 msnm; temperatura media anual de 15.9 °C y precipitación media anual de 645 mm.

3.2.2 Protocolos y diseños experimentales

El proyecto se dividió en dos fases. En la primera, se realizaron estudios de laboratorio *in vitro*, en los cuales se evaluaron dos diluyentes de prueba de corta duración, para semen fresco de conejo. En la segunda fase se efectuaron pruebas de campo, inseminando artificialmente conejas con semen conservado en los dos diluyentes. La primera fase tuvo una duración de tres meses; se realizaron 16 sesiones de colecta, de las cuales ocho correspondieron a conejos Nueva Zelanda Blanco (NZB) y ocho para California (CA), haciéndose de forma alterna. En cada sesión y para cada raza, en un día de trabajo, se colectó semen de la primera y segunda eyaculación de varios machos (seis a

diez) hasta completar 10 mL, se seleccionaron por su motilidad total subjetiva por mayor de 75 %. De este conjugado seminal heterospermático se utilizaron 8 mL, los cuales fueron añadidos aleatoriamente en cantidades iguales a cuatro tubos de dilución o conservación conteniendo 2 mL de los diluyentes de prueba. Dos con una solución *buffer* salina fosfatada enriquecida adicionada con gel (SBSF_E + Gel) y dos con una solución *buffer* salina fosfatada estándar + gel o control (SBSF + Gel). Bajo este protocolo se conformaron cuatro tratamientos experimentales como sigue: 1) semen de conejos NZB diluido en SBSF_E + Gel; 2) semen de conejos NZB diluido en SBSF + Gel; 3) semen de conejo CA diluido en SBSF_E + Gel; y 4) semen de conejo CA diluido en SBSF + Gel. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos y ocho repeticiones por tratamiento, donde la unidad experimental fue una gradilla, que se constituyó por dos tubos de dilución o de conservación. Al final, el número total de tubos o muestras fue 125. Todas las muestras seminales ya diluidas para las dos razas en los dos medios se evaluaron para determinar cambios en la osmolaridad, la calidad espermática y el potencial reproductivo a las 0, 1 y 2 horas de conservación, utilizando un osmómetro y el sistema de análisis de semen computarizado (CASA, Apéndices 1 y 2).

Para la fase de campo, se utilizaron 40 conejas Nueva Zelanda Blanco no lactantes con uno a tres partos en su historial reproductivo; las conejas fueron pesadas individualmente para formar cuatro grupos homogéneos de 10 conejas cada uno. Estos grupos de conejas se asignaron aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos experimentales como sigue: 1) inseminación artificial inmediatamente después de la dilución (hora 0) con semen diluido en solución SBSF_E + Gel; 2) inseminación a las 3 horas de conservación con SBSF_E + Gel; 3) inseminación a la hora 0 de conservación con SBSF + Gel; y 4) inseminación a las 3 horas de conservación con SBSF + Gel. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue una coneja. Previo a la inseminación artificial se estimó, con apoyo del sistema CASA, el número de espermatozoides vivos normales progresivos móviles en 4.0 mL de conjugado seminal diluido a las

horas 0 y 3 para calcular la concentración en 0.8 mL de dosis seminal por coneja. Para esta fase de campo, las inseminaciones se completaron en dos sesiones y se evaluó la información de un parto.

3.2.3 Medio ambiente e instalaciones

Los conejos, tanto hembras como machos, se alojaron en módulos con ambiente natural provisto de aislamiento térmico en el techo y las paredes. Los sementales se mantuvieron en jaulas metálicas galvanizadas individuales de 45 × 60 × 40 cm en un sistema flat-deck o en línea, mientras que las dimensiones de las jaulas individuales tipo americano para reproductoras fueron de 90 x 60 x 40 cm. Cada jaula fue provista de un comedero de tolva tipo inglés con una capacidad de 1.5 kg y un bebedero automático tipo tetina.

3.2.4 Nutrición y alimentación

Se proporcionó un alimento comercial en pellets, para machos y hembras (Tepexpan®; Conejo Reproductor) con 17.4 % de proteína cruda, 5.3 % de grasa, 15.0 % de fibra cruda, 8.0 % de cenizas, 44.2 % de extracto libre de nitrógeno, 1.2 % calcio, 0.7 % fósforo, 2608 kcal de energía digestible kg⁻¹ y 10.1 % de humedad. Los sementales durante las dos fases experimentales fueron restringidos a razón de 150 g día⁻¹ de alimento. Las conejas reproductoras a partir de la inseminación hasta el día de la palpación recibieron el alimento de forma restringida a 150 g día⁻¹, mientras que las gestantes recibieron el alimento *ad-libitum*.

3.2.5 Manejo sanitario

Antes del inicio de las fases experimentales, las jaulas fueron flameadas, lavadas y desinfectadas con sales cuaternarias de amonio (Bactosan Espray; Química pH). Tanto los machos como las hembras, previo al inicio de los experimentos se desparasitaron y trataron para enfermedades respiratorias y digestivas. En el primer día los conejos se desparasitaron con 0.1 mL de Ivermectina de amplio espectro, inyectada subcutáneamente (Econovet), y para el segundo día y durante 5 días se les administró en el agua de bebida 75 mg kg⁻¹ de peso vivo de Diametoprim (Sanfer), cuyo contenido del producto es de 8

mg de sulfamonometoxina sódica y 1.6 mg de trimetoprim. A partir del sexto día se les suministró 1 g L⁻¹ de agua de Vitafort A (Parfarm) durante tres días como reconstituyente.

3.2.6 Preparación de diluyentes de prueba

La solución *buffer* salina fosfatada estándar adicionada con gel (SBSF + Gel) se preparó añadiendo a un matraz con 1000 mL de agua inyectable PISA®, 8.0 g L⁻¹ de cloruro de sodio, 0.2 g L⁻¹ de cloruro de potasio, 1.15 g L⁻¹ de fosfato bisódico y 0.2 g L⁻¹ de fosfato mono potásico a 1000 mL. Esta solución se calentó a 115 °C durante 15 minutos para su esterilización y eliminación de impurezas, empleando una olla exprés. Posteriormente, a esta solución aún caliente, se le añadieron 16.0 g de grenetina comercial en polvo incolora e insabora y se disolvió con el uso de un vórtex. A esta solución se le añadieron cantidades variables de sulfato de estreptomicina y bencilpenicilina procaínica. Una vez completado este procedimiento, la solución se ajustó a un pH de 7.4 con hidróxido de sodio (1 M) empleando un potenciómetro portátil Modelo pH10 (Conductronic S. A., México). Una vez preparados los diluyentes, se conservaron en refrigeración en tubos para centrifugación Falcón a 5 °C. Para su uso, los tubos se colocaron en baño María a 32 °C para su desgelificación.

La solución *buffer* salina fosfatada enriquecida (SBSF_E + Gel) se preparó de la misma forma que la SBSF + Gel estándar en 1000 mL de agua inyectable, pero se le añadieron cantidades variables de glucosa, fructosa, tris-hidroximetilaminometano (TRIS) y ácido etildiaminotetraacético (EDTA), y la misma cantidad de grenetina que la SBSF estándar. Una vez de preparada esta solución, se adicionaron las mismas cantidades variables de sulfato de estreptomicina y bencilpenicilina procaínica adicionadas en la SBSF estándar. El medio también se ajustó a un pH de 7.4 con hidróxido de sodio 1 M.

3.2.7 Protocolo de colección y análisis de semen

Las colecciones de semen se realizaron los lunes y jueves de cada semana comenzando a las 8:00 am. En cada día de trabajo, se colectó el semen del primer y segundo eyaculado de 6 a 10 conejos, para lo cual se utilizó una

vagina artificial de tipo inglés de acuerdo con el método de Walton (1945), conteniendo en su interior agua a 45 °C. Para la extracción seminal se utilizó una coneja de apoyo. Las muestras seminales se mantuvieron en baño María a 32 °C para su conservación y evaluación. El volumen se midió una vez removido el gel, empleando tubos colectores graduados de 0.2 hasta 1 mL. Para cada sesión y raza, se seleccionaron las muestras de semen de varios machos (seis a diez) con volúmenes mayores a 0.2 mL y con motilidades espermáticas subjetivas totales superiores del 75 %. Los eyaculados seleccionados se mezclaron en tubos pírrex graduados para obtener muestras heterospermáticas hasta alcanzar 10 mL de semen en cada sesión de trabajo y raza para las pruebas de laboratorio *in vitro*. Con esta cantidad de semen colectado de varios machos, a cada tubo de dilución con 2.0 mL de medio de conservación, ya sea SBSF_E + Gel o SBSF + Gel, se le adicionó 2.0 mL del conjugado seminal.

Para las pruebas de calidad seminal a las 0, 1 y 2 horas, cada una de las muestras se diluyeron en una proporción 1:5, se tomó una alícuota de 50 µL del semen diluido y se mezcló con 250 µL de solución *buffer* salina fosfatada (Dulbecco A; Oxoid Inc., UK). La dilución se adecuó en el caso de que la concentración espermática fuera muy baja o alta, para así cumplir con los estándares del sistema de evaluación digital de semen CASA. Para continuar con el procedimiento de evaluación, se realizó una segunda dilución con una tinción Viadent (Hoechst 33258) 1:1, para lo cual se tomaron 100 µL de la dilución anterior y se colocó junto con 100 µL de Viadent. La tinción Viadent contiene bisBenzimida Triclorhidrato y utiliza luz fluorescente la cual permite determinar el número de células no viables, ya que sólo se tiñen las células que no tienen las membranas intactas. Posteriormente, se tomó una alícuota (± 3 µL) de la última dilución y se sometió al sistema de análisis de semen computarizado (CASA IVOS II, v 1.7, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA) para la evaluación espermática. Para dicho análisis, las muestras se incubaron por 2 min a 37 °C dentro del IVOS II en una Leja (porta objeto de profundidad fija desechable) de 20 micrones de profundidad. Para determinar las

osmolaridades de los conjugados seminales a las horas 0, 1 y 2 post-dilución, se tomaron 50 μ L de semen y diluido en una solución *buffer* salina fosfatada (Fallas, 2016) y sometida a prueba utilizando el equipo Osmomat 3000 (Genotec GmbH).

3.2.8 Bioestímulo y procedimientos de inseminación artificial en pruebas de campo

Para la fase de campo y previo a la inseminación artificial, las conejas se cambiaron de lugar y jaula durante ocho horas como bioestímulo para sincronizar estros. La inseminación artificial se desarrolló de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez-De Lara (1996), en la cual se sujetó a la coneja en posición supina y se introdujo una pipeta de pyrex tipo inglés a través de la vagina a 6 cm de profundidad. La dosis seminal heterospermática para cada coneja fue de 0.8 mL. Las conejas utilizadas, se inseminaron a las 0 y 3 horas de conservación siguiendo el protocolo experimental. Inmediatamente después de que se completaron las inseminaciones, las conejas se indujeron a la ovulación administrando en el músculo bíceps-femoral 20 μ g de Gonadorelina (Fertagil, Intervet).

3.2.9 Variables de respuesta

Fase de laboratorio

Las variables de respuesta que se evaluaron a las horas 0, 1, y 2 de conservación del conjugado heterospermático seminal para los dos diluyentes de prueba fueron: osmolaridad (mOsmol/kg^{-1}), concentración espermática por mL ($\times 10^6$), viabilidad (%), normalidad (%), inmovilidad (%), motilidad total (%), motilidad progresiva (%); VSL: velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$) y LIN: índice de linealidad (%). Para estas últimas determinaciones se contaron al menos 400 espermatozoides por muestra de cada tubo de dilución. Con base a esta información, se calculó el número de espermatozoides vivos normales progresivos móviles por volumen de conjugado seminal y dosis potenciales para uso en inseminación artificial.

Fase de campo

Para esta fase se evaluó la tasa de receptividad sexual, tasa de parto y el número de gazapos nacidos totales y vivos por camada.

3.2.10. Análisis estadísticos

Para las pruebas de laboratorio *in vitro*, las osmolaridades, características de los espermatozoides y potenciales reproductivos, se sometieron a un análisis de varianza en el que se consideró el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + D_j + T_k + (R * D)_{ij} + (R * T)_{ik} + (D * T)_{jk} + b_1(X_{ijkl} - \bar{X}) + b_2(X_{ijkl} - \bar{X}) + \varepsilon_{ijkl}$$

donde Y_{ijkl} es la variable respuesta; μ es la media general; R_i es el efecto fijo de la i -ésima raza ($i = \text{NZB, CA}$); D_j es el efecto fijo del j -ésimo diluyente ($j = \text{SBSF}_E + \text{Gel, SBSF} + \text{Gel}$); T_k es el efecto fijo del k -ésimo tiempo de conservación (0, 1, 2 horas); $(R * D)_{ij}$ es la interacción entre raza y tipo de diluyente; $(R * T)_{ik}$ es la interacción entre raza y tiempo de conservación; $(D * T)_{jk}$ es la interacción entre tipo de diluyente y tiempo de conservación; b_1 es el coeficiente de regresión lineal de la covariable orden de sesión; b_2 es el coeficiente de regresión lineal de la covariable concentración espermática total por volumen del conjugado seminal; y ε_{ijkl} es el residual $\sim NI(0, \sigma_e^2)$.

Para la prueba de campo, la tasa de receptividad y la tasa de partos fueron consideradas como variables de Bernoulli (variable 0, 1). La tasa de receptividad, la tasa de partos y los tamaños de camada al parto se sometieron a un análisis de varianza en el que se consideró el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + (D * T)_{ij} + b_1(X_{ijk} - \bar{X}) + b_2(X_{ijk} - \bar{X}) + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable respuesta; μ es la media general; D_i es el efecto fijo del i -ésimo tipo de diluyente ($i = \text{SBSF}_E + \text{Gel, SBSF} + \text{Gel}$); T_j es el efecto fijo del j -ésimo tiempo de conservación ($j = 0, 3$ horas); $(D * T)_{ij}$ es la interacción entre el tipo de diluyente y tiempo de conservación; b_1 es el coeficiente de regresión

lineal de la covariable orden de parto de la coneja; b_2 es el coeficiente de regresión lineal de la covariable peso de la coneja al momento de la inseminación artificial y ε_{ijk} es el residual $\sim NI(0, \sigma^2_e)$.

Las variables en porcentajes de las pruebas *in vitro* de laboratorio se transformaron utilizando arco seno y las concentraciones espermáticas mediante log 10. Todos los análisis de varianza se realizaron con los datos originales y transformados. Las covariables no significativas ($p > 0.05$) se eliminaron del modelo y si fue el caso, la información se analizó nuevamente. Las variables de respuesta en las pruebas de laboratorio se analizaron mediante cuadrados medios mínimos utilizando el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS, 2016). Para las variables de comportamiento reproductivo se analizaron mediante GLM de SAS. Las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba de Tukey. Coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados por PROC CORR de SAS.

3.3 Resultados

3.3.1. Fase de laboratorio estudios *in vitro*

Se analizaron un total de 125 muestras para la evaluación de las diferentes variables de estudio. En el Cuadro 1 se presentan las estadísticas descriptivas para osmolaridad, concentración espermática por mL, inmovilidad, viabilidad, normalidad, motricidad, velocidad, la progresión espermática y el potencial reproductivo en estudios *in vitro*. Los coeficientes de variación más bajos correspondieron a los porcentajes de espermatozoides viables y normales, mientras que los más altos correspondieron a los porcentajes de espermatozoides estáticos, número de espermatozoides vivos normales mótils progresivos por volumen de conjugado seminal y dosis para inseminación artificial (IA).

La covariable orden de sesión fue significativa ($p < 0.05$) en 3 de las 10 variables analizadas. Las variables influenciadas por esta covariable fueron ajustadas a una sesión estándar de 5.9. La concentración espermática por mL, como covariable, mostró influir ($p < 0.05$) en cinco de las variables de estudio, por lo que fueron ajustadas a una concentración estándar de 753.5×10^6 .

Cuadro 1. Estadísticos descriptivos y coeficientes de variación para osmolaridad, calidad espermática y potencial reproductivo en conjugados seminales de conejos.

Variable	N	Min	Max	Media	DE	CV
Osmolaridad (mOsmol/kg ⁻¹)	125	222.0	407.0	293.6	44.1	15.0
Concentración espermática/mL (x 10 ⁶)	125	161.0	1842.8	757.0	316.5	41.8
Espermatozoides estáticos (%)	125	2.3	34.4	10.0	0.2	62.1
Espermatozoides viables (%)	125	90.3	100.0	96.2	1.7	1.7
Espermatozoides normales (%)	125	88.6	98.9	95.6	2.1	2.1
Motilidad total (%)	125	65.6	97.7	90.0	6.2	6.9
Motilidad progresiva (%)	125	6.9	72.8	45.7	14.0	30.5
VSL (µm/s)	125	20.3	97.4	68.2	10.6	15.5
LIN (%)	125	24.4	58.3	43.2	7.0	16.2
EVNMP (x 10 ⁶)	125	82.5	1876.0	633.0	334.5	52.8
Número de dosis potenciales para IA*	125	4.1	93.8	31.7	16.7	52.8

DE= Desviación estándar; CV= Coeficiente de variación (%); VSL: Velocidad rectilínea; LIN: Índice de linealidad; EVNMP: Espermatozoides vivos normales móviles progresivos por volumen de conjugado seminal.

* - Calculada para una concentración de 20 x 10⁶ de espermatozoides en 0.8 mL de diluyente.

El efecto de raza, tipo de diluyente y tiempos de conservación en la osmolaridad, normalidad, viabilidad, movilidad, cinética espermática y potencial reproductivo son mostrados en el Cuadro 2. La viabilidad espermática en diluciones con solución SPSF_E + Gel fue mayor ($p=0.0004$) que SBSF + Gel. No obstante, el porcentaje de espermatozoides normales no fue influenciado ($p>0.05$) por el tipo de diluyente. Este factor mostró afectar la osmolaridad ($p=0.0001$), los porcentajes de espermatozoides vivos ($p=0.0004$), estáticos ($p=0.0005$), móviles totales ($p=0.004$) y progresivos móviles ($p=0.0001$), la velocidad rectilínea (VSL; $p=0.001$), el índice de linealidad (LIN; $p=0.0001$), la concentración de espermatozoides vivos normales progresivos móviles (EVNMP) por volumen de conjugado seminal ($p=0.0001$), y el número de dosis potenciales para IA ($p=0.0001$).

Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de raza, tipo de diluyente y tiempo de conservación en la osmolaridad, calidad espermática y potencial reproductivo en conjugados seminales de conejo.

Variable	Raza		Valor- <i>P</i>	Diluyente		Valor- <i>P</i>	Hora			Valor- <i>P</i>
	NZB (n = 56)	CA (n = 69)		SPSF _E + G (n = 59)	SBSF + G (n = 66)		0 (n = 41)	1 (n = 42)	2 (n = 42)	
Osmolaridad (mOsmol/kg ⁻¹) °	286.7 $\pm$ 4.6 ^b	301.8 $\pm$ 4. 1 ^a	0.019	319.8 $\pm$ 4. 4 ^a	268.7 $\pm$ 4.2 ^b	0.0001	293.8 $\pm$ 5.2	292.3 $\pm$ 5.3	296.7 $\pm$ 5.3	0.834
Estáticos (%) *	7.7 $\pm$ 0.7 ^b	12.0 $\pm$ 0.7 ^a	0.0001	11.3 $\pm$ 0.7 ^a	8.5 $\pm$ 0.6 ^b	0.0004	8.7 $\pm$ 0.9 ^a	8.8 $\pm$ 0.8 ^b	12.2 $\pm$ 0.8 ^a	0.005
Viabilidad (%) °*	96.0 $\pm$ 0.2	96.4 $\pm$ 0.2	0.151	96.7 $\pm$ 0.2 ^a	95.7 $\pm$ 0.2 ^b	0.0004	96.3 $\pm$ 0.2	96.2 $\pm$ 0.2	96.1 $\pm$ 0.2	0.860
Normalidad (%)	96.4 $\pm$ 0.2 ^a	94.9 $\pm$ 0.2 ^b	0.0001	95.7 $\pm$ 0.2	95.7 $\pm$ 0.2	0.885	94.7 $\pm$ 0.3 ^b	96.1 $\pm$ 0.3 ^a	96.2 $\pm$ 0.3 ^a	0.0004
Motilidad total (%) *	92.3 $\pm$ 0.7 ^a	88.0 $\pm$ 0.6 ^b	0.0001	88.7 $\pm$ 0.7 ^b	91.5 $\pm$ 0.6 ^a	0.004	91.3 $\pm$ 0.9 ^a	91.2 $\pm$ 0.8 ^a	87.8 $\pm$ 0.8 ^b	0.005
Motilidad progresiva (%)	55.4 $\pm$ 1.0 ^a	37.4 $\pm$ 0.9 ^b	0.0001	40.8 $\pm$ 1.0	52.0 $\pm$ 1.0	0.0001	50.7 $\pm$ 1.2 ^a	48.6 $\pm$ 1.2 ^a	39.9 $\pm$ 1.2 ^b	0.0001
VSL (μ m/s)	75.8 $\pm$ 1.0 ^a	61.9 $\pm$ 0.9 ^a	0.0001	66.7 $\pm$ 1.0 ^b	71.0 $\pm$ 0.9 ^a	0.001	67.5 $\pm$ 1.1 ^b	72.4 $\pm$ 1.1 ^a	66.7 $\pm$ 1.1 ^b	0.0001
LIN (%) °	47.4 $\pm$ 0.5 ^a	39.6 $\pm$ 0.5 ^b	0.0001	39.7 $\pm$ 0.5 ^b	47.2 $\pm$ 0.5 ^a	0.0001	46.2 $\pm$ 0.6 ^a	43.8 $\pm$ 0.6 ^b	40.4 $\pm$ 0.6 ^c	0.0001
EVNMP (x 10 ⁶) *	761.5 $\pm$ 16.3 ^a	523.4 $\pm$ 14.6 ^a	0.0001	572.3 $\pm$ 16.1 ^b	712.6 $\pm$ 15.1 ^a	0.0001	691.5 $\pm$ 20.1 ^a	681.3 $\pm$ 18.8 ^a	554.5 $\pm$ 19.3 ^b	0.0001
Dosis IA*	38.1 $\pm$ 0.82 ^a	26.2 $\pm$ 0.73 ^b	0.0001	28.6 $\pm$ 0.81 ^b	35.6 $\pm$ 0.75 ^a	0.0001	34.6 $\pm$ 1.0 ^a	34.1 $\pm$ 0.94 ^a	27.7.9 $\pm$ 0.97 ^b	0.0001

° - Sesión usada como covariable.

* - Concentración espermática/mL usada como covariable.

^{abc} - Letras con diferentes superíndices en la misma hilera dentro de efecto son diferentes ($p < 0.05$).

La dilución de conjugado seminal con SBSF_E + Gel incrementó la osmolaridad en 51.1 unidades, comparadas con SBSF + Gel (+19.0 %). Este factor mostró ser determinante en los resultados obtenidos en cuanto a la calidad espermática y potenciales reproductivos. La dilución con el primer medio aumentó el porcentaje de espermatozoides estáticos en 32.9 %, y disminuyó la motilidad total y progresiva en 3.1 y 27.4 % con respecto al segundo medio. Asimismo, disminuyó VSL y LIN en 6.4 y 18.9 % con respecto al segundo. En promedio, EVNMP en 4.0 mL de conjugados seminales y número de dosis en SBSF + Gel fueron superiores en 140.3 millones y 8 unidades comparados con el diluyente SBSF_E + Gel, lo que corresponde a aumentos del 24.5 y 24.4 %, respectivamente.

Se encontró un efecto de raza en la osmolaridad ($p=0.02$) y en los porcentajes de espermatozoides normales ($p=0.0001$), estáticos ($p=0.0001$), mótils totales ($p=0.0001$), mótils progresivos ($p=0.0001$), VSL ($p=0.0001$), LIN ($p=0.0001$), así como en EVNMP ($p=0.0001$) y número de dosis ($p=0.0001$).

Las osmolaridades de las diluciones de conjugados seminales de la raza NZB fueron inferiores en 15.1 unidades (-5.3 %) comparadas con aquellos de conejos CA. Para esta última raza el porcentaje de espermatozoides estáticos fue mayor en 55.8 % y la normalidad espermática se vio reducida en 1.6 % comparada con la raza NZB. Además, las motilidades total y progresiva en conjugados de NZB fueron superiores que de CA en un 4.9 y 48.1 %, respectivamente. La VSL y LIN fueron mayores ($p=0.0001$) en diluciones provenientes de conjugados de conejos NZB que de conejos CA en un 22.4 y 19.7 %, respectivamente. Asimismo, se encontró que EVNMP y dosis para conjugados seminales de la primera raza, en promedio, fueron superiores en 238.1 millones y 11.9 unidades, comparados con la segunda raza, lo que representan aumentos de 45.5 y 45.4 %, respectivamente.

No se encontraron efectos ($p>0.05$) de horas de conservación en la osmolaridad y en los porcentajes de viabilidad espermática. No obstante, este factor afectó el porcentaje de espermatozoides estáticos ($p=0.005$), normalidad

($p=0.0004$), motilidad total ($p=0.005$), motilidad progresiva ($p=0.0001$), VSL ($p=0.0001$), LIN ($p=0.0001$), EVNMP ($p=0.0001$) y número de dosis ($p=0.0001$).

El porcentaje de espermatozoides estáticos a la hora 0 y 1 fueron similares ($p>0.05$), pero para la hora 2 se observó un incremento de un 40.2 y 38.6 % comparado con las primeras horas. Asimismo, la normalidad espermática a la hora 0 fue menor con respecto a las horas 1 y 2 en un 0.9 y 0.8 %, respectivamente. Por su parte, los porcentajes de motilidad total para las horas 0 y 1 fueron similares, pero a la hora 2, estos valores disminuyeron en un 4 y 3.9 % comparadas con las horas previas. Siguiendo este mismo patrón, la motilidad progresiva a la hora 2, se redujo en un 27.1 y 21.8 % con relación a la hora 0 y 1. Las velocidades de los espermatozoides VSL a la hora 1 fueron superiores en un 7.2 y 8.5 % que las observadas a las 0 y 2 horas, respectivamente. LIN entre la hora 0 y 2 de conservación disminuyó en un 14.3 %. En promedio, EVNMP para la hora 0 y 1 fueron similares pero superiores en 137 y 126.8 millones comparados con la hora 2, lo que corresponde a mayores concentraciones en 24.7 y 22.9 %, respectivamente. Para el caso del número de dosis se observó un patrón similar, obteniéndose 6.9 (+24.9 %) y 6.4 (+23.1 %) más dosis a la hora 0 y 1 que a la hora 2.

Se encontraron efectos de interacción entre raza y tipo de diluyente ($p<0.01$) para la osmolaridad, porcentaje de espermatozoides estáticos, motilidad total y progresiva como se puede observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la osmolaridad y características de movilidad espermática en conejos.

Variable	Nueva Zelanda Blanco		California		Valor- <i>P</i>
	SBSF _E + G	SBSF + G	SBSF _E + G	SBSF + G	
	(n = 26)	(n = 30)	(n = 33)	(n = 36)	
Osmolaridad (mOsmol/kg ⁻¹) [°]	304.2 $\pm$ 6.67 ^b	269.0 $\pm$ 6.25 ^c	335.4 $\pm$ 5.93 ^a	268.1 $\pm$ 5.65 ^c	0.0009
Espermas estáticos*	8.1 $\pm$ 1.04 ^b	7.3 $\pm$ 0.95 ^b	14.4 $\pm$ 0.90 ^a	9.6 $\pm$ 0.88 ^b	0.033
Motilidad total (%)*	91.9 $\pm$ 1.04 ^a	92.7 $\pm$ 0.95 ^a	85.5 $\pm$ 0.90 ^b	90.4 $\pm$ 0.88 ^a	0.032
Motilidad progresiva (%)	51.5 $\pm$ 1.54 ^b	59.3 $\pm$ 1.44 ^a	30.2 $\pm$ 1.37 ^d	44.6 $\pm$ 1.31 ^c	0.022

[°] - Sesión usada como covariable.

* - Concentración espermática/mL usado como covariable.

^{abc} - Letras con diferentes superíndices en la misma hilera son diferentes ($p < 0.05$).

La osmolaridad de los conjugados seminales diluidos con SBSF_E + Gel provenientes de la raza CA fueron significativamente superiores que aquellos de la raza NZB (+10.2 %). Mientras que las osmolaridades para las diluciones con SBSF + Gel para las dos razas fueron iguales, pero estadísticamente diferentes con respecto a los valores observados con SBSF_E + Gel para las dos razas (Figura 1).

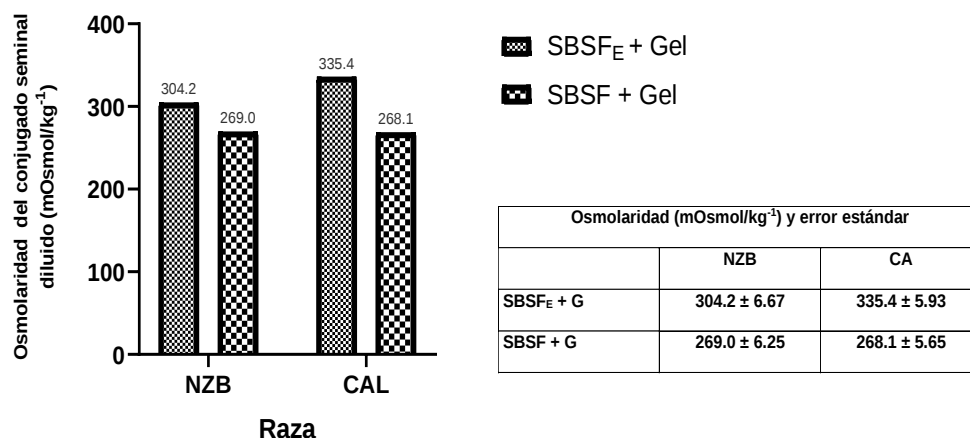


Figura 1. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la osmolaridad del conjugado seminal de conejos.

El porcentaje de espermatozoides estáticos en el conjugado seminal de conejos NZB, tanto para diluciones con SBSF_E + Gel como SBSF + Gel, fueron similares. No obstante, cuando conjugados de semen de conejos CA se diluyeron en SBSF_E + Gel, el porcentaje de espermatozoides estáticos se incrementó significativamente con respecto a SBSF + Gel, en un 50 % (Figura 2).

La motilidad total en conjugados seminales provenientes de conejos NZB no fueron diferentes entre SBSF_E + Gel y SBSF + Gel, mientras que en conjugados de conejos CA, la motilidad total se vio reducida significativamente en el primero con respecto al segundo (-5.7 %). Conjugados de conejos CA diluidos con SBSF + Gel no fueron diferentes comparados con los dos diluyentes para la raza NZB (Figura 3).

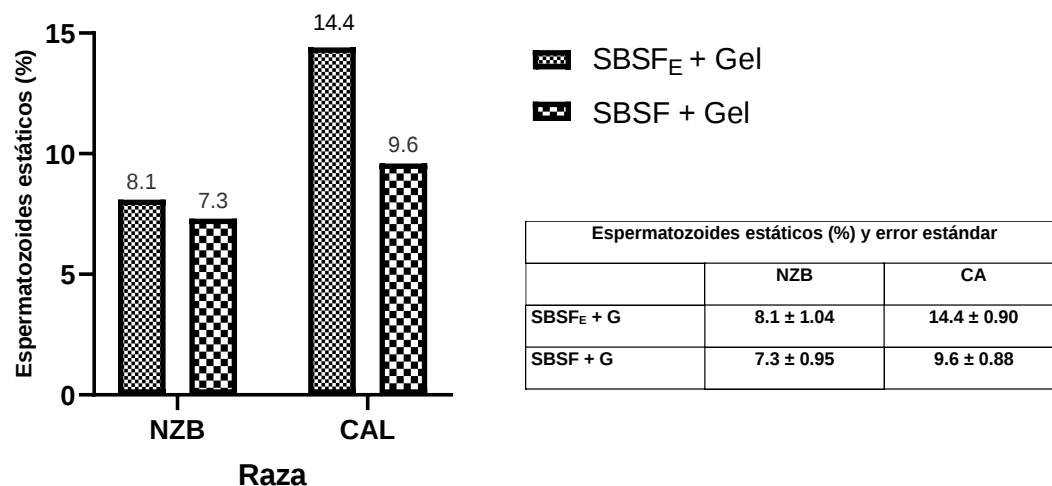


Figura 2. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en el porcentaje de espermatozoides estáticos en el conjugado seminal de conejos.

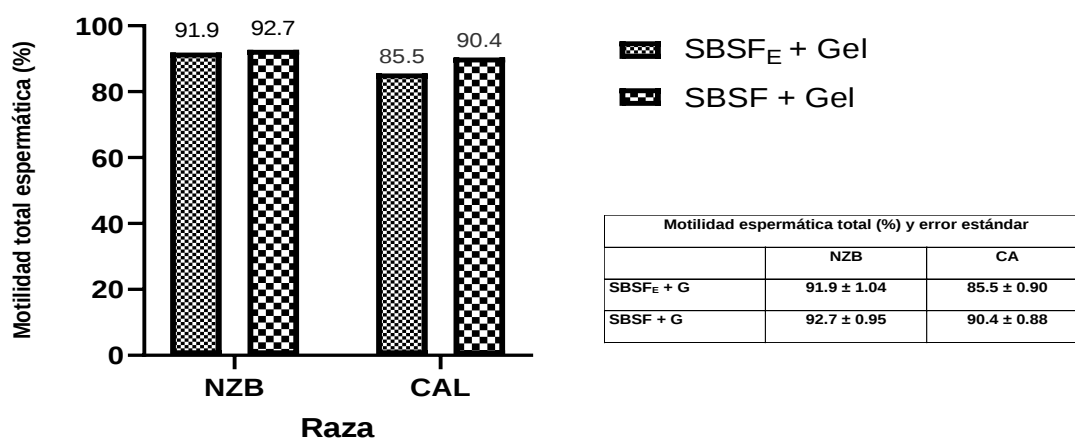


Figura 3. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la motilidad total espermática en el conjugado seminal de conejos.

La motilidad progresiva en conjugados seminales diluidos provenientes de conejos NZB y CA fueron significativamente superiores en SBSF + Gel vs SBSF_E + Gel en 15.1 y 47.7 %, respectivamente. Mientras que los valores para esta característica para los dos diluyentes fueron consistentemente menores en conjugados de conejos CA (Figura 4).

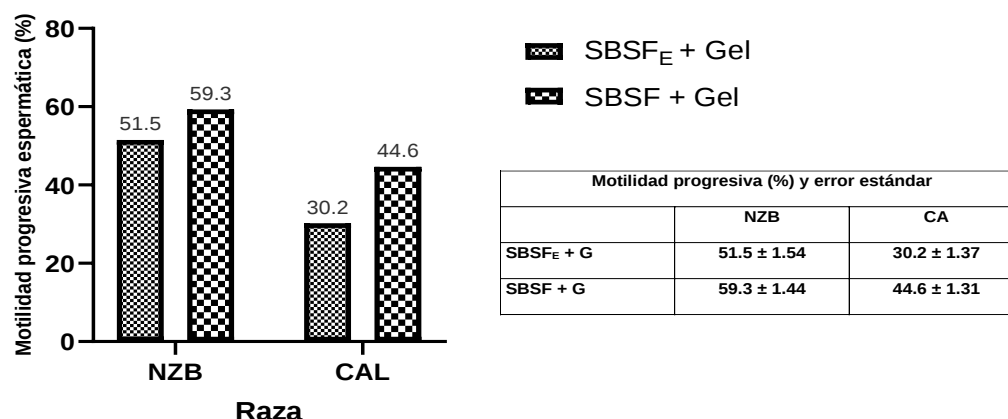


Figura 4. Efecto de la interacción entre raza y tipo de diluyente en la motilidad progresiva espermática en el conjugado de semen de conejos.

3.3.2. Fase de campo

Los efectos de tipo de diluyente y horas de conservación en la receptividad sexual, tasa de partos y el número de gazapos nacidos totales y vivos al parto en conejas Nueva Zelanda Blanco son mostrados en el Cuadro 4. Con base a la información recabada con el sistema CASA y de acuerdo con la dosis de 0.8 mL de semen diluido tomado de los tubos de conservación con 4.0 mL de conjugado seminal, en promedio, la concentración de espermatozoides vivos normales progresivos mótils en la dosis de inseminación diluidos en SBSF_E + Gel y SBSF + Gel para la hora 0 fueron de 99.4 y 109.2×10^6 , mientras que para la hora 3 para estos mismos diluyentes fueron de 34.6 y 53.1×10^6 , respectivamente.

Cuadro 4. Media de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de tipo de diluyente y tiempos de conservación en la receptividad sexual, fertilidad y prolificidad en conejas inseminadas artificialmente.

Factor	Receptividad (%) (n = 40)	Tasa de partos (%) * (n = 40)	Nacidos totales* (n = 37)	Nacidos Vivos* (n = 37)
<i>Tipo de diluyente</i>				
SBSF _E + Gel	0.95 ± 0.07	0.85 ± 0.07	7.11 ± 0.77	6.57 ± 0.77
SBSF + Gel	0.80 ± 0.07	0.85 ± 0.07	7.44 ± 0.77	7.13 ± 0.77

Valor-P	0.168	0.936	0.766	0.613
<i>Tiempo de conservación</i>				
0 horas	0.85 ± 0.07	0.90 ± 0.07	8.04 ± 0.78	7.48 ± 0.78
3 horas	0.90 ± 0.07	0.80 ± 0.07	6.50 ± 0.78	6.21 ± 0.78
Valor-P	0.642	0.367	0.182	0.266
<i>Diluyente*tiempo</i>				
SBSF _E + Gel 0 horas	0.90 ± 0.11	0.91 ± 0.10	7.71 ± 1.09	7.09 ± 1.08
SBSF _E + Gel 3 horas	1.00 ± 0.11	0.78 ± 0.10	6.52 ± 1.09	6.05 ± 1.09
SBSF + Gel 0 horas	0.80 ± 0.11	0.88 ± 0.10	8.38 ± 1.11	7.88 ± 1.11
SBSF + Gel 3 horas	0.80 ± 0.11	0.83 ± 0.10	6.49 ± 1.11	6.38 ± 1.10
Valor-P	0.642	0.696	0.750	0.837

*- Orden de parto usada como covariable

La covariable orden de parto fue significativa para la tasa de partos ($p=0.0007$), número de gazapos nacidos totales ($p=0.01$) y vivos ($p=0.03$) por camada; estas variables fueron ajustadas a un orden de parto estándar de 3.8. El peso de las conejas al momento de la IA como covariable no fue significativa ($p>0.05$) para la tasa de partos y prolificidad. No obstante, a las diferencias de las concentraciones espermáticas en las dosis seminales, no se encontraron efectos ($p>0.05$) de tipo de diluyente y horas de conservación e interacción tipo de diluyente*hora de conservación en las tasas de partos y la prolificidad en las conejas inseminadas artificialmente. Sin embargo, se encontraron ciertas tendencias a que el número de gazapos nacidos totales ($p=0.182$) y nacidos vivos ($p=0.182$) fueran numéricamente mayores a la hora 0 comparada con la hora 3 de conservación. Gazapos nacidos totales y nacidos vivos producto de inseminaciones realizadas a la hora 0 produjeron en promedio 1.5 y 1.3 unidades más comparados con la hora 3, respectivamente. Estas diferencias numéricas son explicadas por la disminución de espermatozoides vivos normales progresivos móviles en la dosis seminal entre la hora 0 y 3 de conservación para los dos diluyentes.

3.4. Discusión

En la fase 1 de laboratorio *in vitro*, se compararon dos diluyentes *buffers* de corta duración para conservación de semen fresco de conejo Nueva Zelanda Blanco y California mantenido a 32°C, con el objetivo de determinar sus efectos en la osmolaridad, calidad espermática y potencial reproductivo a diferentes tiempos de conservación. En la fase de campo, se evaluó el efecto de tipo de diluyente y tiempos de conservación en el comportamiento reproductivo de conejas Nueva Zelanda Blanco inseminadas artificialmente.

Existen pocos estudios relacionados a la utilización de diluyentes basados en soluciones *buffers* salinas fosfatadas, enriquecidas y adicionadas con gel para conservación de semen fresco de conejo mantenidos a 32 °C. La conservación de semen a corta o larga duración persigue entre otras ventajas, el de prolongar la vida fértil de los espermatozoides, proporcionarles las condiciones adecuadas para mantener sus propiedades funcionales, ultraestructurales y bioquímicas (Salamon & Maxwell, 2000). La forma en que los diluyentes actúan es estabilizando la membrana plasmática, manteniendo las concentraciones iónicas intracelulares e intramembranales y protegiendo a los espermatozoides de cambios de temperaturas y de presiones osmóticas (Albiaty et al., 2016; Arando et al., 2019; Salamon & Maxwell, 2000).

Aunque existen diferentes criterios para determinar la calidad seminal, la viabilidad y motilidad espermática son consideradas como los principales indicadores relacionados con la fertilidad (Kathiravan, Kalatharan, Karthikeya, Rengarajan, & Kadirvel, 2011; Robayo, Montenegro, Valdés, & Cox, 2008), debido a que ayudan a los espermatozoides a migrar a lo largo del tracto reproductor de la hembra, lo que favorece la interacción de gametos durante el proceso de la fertilización (Robayo et al., 2008). Estudios han demostrado que estas características dependen en gran medida de la integridad de las membranas plasmáticas y mitocondrial (Gadella & Evans, 2011) y factores como temperaturas, concentraciones de solutos y composiciones químicas de los diluyentes que afectan la calidad de los espermatozoides y su sobrevivencia durante el proceso de conservación (Rizkallah et al., 2022). Por lo anterior, los

medios de conservación seminal deberían permitir la preservación del mayor número de espermatozoides vivos normales mótils progresivos con adecuados patrones de velocidades y progresividades, ya que estas células son las que tendrían el mayor potencial en sus capacidades fertilizadoras. Además, estas características de movilidad espermática dependerán del número de dosis potenciales para uso en IA que repercutirán en la eficiencia reproductiva.

Las características de viabilidad, inmovilidad, normalidad, motilidad total, motilidad progresiva y algunos parámetros de velocidad y progresión espermática en el presente estudio fueron evaluadas mediante el sistema CASA, lo que permitió en los ensayos *in vitro* estimar con cierto grado de precisión el número de espermatozoides vivos normales mótils progresivos por volumen de conjugado seminal, su cinética de movimiento y dosis potenciales para uso en programas de inseminación artificial en relación al tipo de diluyente, raza y tiempos de conservación.

En el presente estudio, no se determinaron las osmolaridades de los conjugados seminales heterospermáticos proveniente de varios machos para las dos razas antes de diluirlos en los medios de conservación. No obstante, estudios previos realizados en COCICEMAC, R. Rodríguez-De Lara (comunicación personal 10 de marzo de 2023) determinaron que las osmolaridades del semen de conejo fresco recién colectado para las razas Nueva Zelanda Blanco y California fueron de 295.0 ± 0.95 ($n = 185$) y 296.5 ± 0.97 ($n = 176$) mOsmol/kg⁻¹, respectivamente. Fallas (2016) reportó para semen de conejos Nueva Zelanda Blanco, un valor de osmolaridades de 308.9 ± 1.0 mOsmol/kg⁻¹.

Las presiones osmóticas de los diluyentes *in situ* utilizados para SBSF_E + Gel y SBSF + Gel fueron de 383.1 y 257 mOsmol/kg⁻¹, mientras que las osmolaridades determinadas para estos mismos diluyentes después de la dilución con los conjugados seminales fueron de 319.8 ± 4.4 y 268.7 ± 4.2 mOsmol/kg⁻¹, respectivamente. Lo anterior muestra que las osmolaridades de los conjugados seminales diluidos en SBSF_E + Gel fueron en promedio

superiores que SBSF + Gel en $51.1 \text{ mOsmol/kg}^{-1}$, y que el primero fue ligeramente hipertónico y el segundo isotónico.

Los porcentajes de viabilidad para los dos diluyentes de prueba fueron altos, significativamente superiores en SBSF_E + Gel comparada con SBSF + Gel, pero en un margen muy estrecho (+1.04 %) y esto se explica por su coeficiente de variación bajo (CV=1.7). De cualquier forma, ambos diluyentes mantuvieron altos porcentajes promedios de viabilidad espermática *in vitro* cuando fueron mantenidos a 32 °C durante las primeras dos horas de conservación, sin cambios aparentes en su normalidad morfológica. No obstante esta alta proporción de espermatozoides viables en los dos diluyentes, estos los mismos experimentaron cambios de comportamiento y en su calidad en respuesta a los factores de variación estudiados.

Investigaciones han demostrado que los diluyentes utilizados para la preservación de semen deben de proporcionar presiones osmóticas y concentraciones de hidrogeniones adecuadas para mantener la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (Alvariño, 1993; Siudzińska & Lukaszewicz, 2008). El pH de *buffers* tiene un efecto importante en el metabolismo espermático (Salisbury & Nakabayashi, 1957), por lo que los diluyentes deben de proporcionar un efecto tampón de pH del semen diluido para balancear la producción de sustancias metabólicas provenientes de los espermatozoides y bacterias (Aurich, 2011). En la presente investigación no se analizaron determinaciones de pH. Sin embargo, con la adición de sustancias *buffers* y el ajuste de pH a 7.4 en los dos diluyentes, es probable que cambios en estas concentraciones durante los tiempos cortos de preservación no hayan ocurrido. En conejos los rangos normales de pH para mantener la calidad espermática oscilan entre 6.8 y 7.5 (Alvariño, 1993).

En este estudio se estimó un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides estáticos con la SBSF_E + Gel. Este resultado es consistente con el reportado en espermatozoides de humanos, donde bajo condiciones hiperosmóticas, el porcentaje de inmovilización de espermatozoides aumenta

(Gao et al., 1993; Gao et al., 1995). Aunque la viabilidad espermática se mantuvo más alta entre medios de conservación, con el diluyente SPSF_E + Gel, ligeramente hipertónico, se redujeron significativamente las características de movilidad, cinética de movimiento y potencial reproductivo, comparadas con diluyente SBSF + Gel isotónico. Estos resultados pueden ser explicados por diferencias en las presiones osmóticas encontradas. La osmolaridad mostró estar correlacionada negativamente con la motilidad total ($r=-0.39$; $p=0.0001$), motilidad progresiva ($r=0.41$; $p=0.0001$), número de espermatozoides vivos normales mótils progresivos por volumen de conjugado seminal ($r=-0.26$; $p=0.003$), dosis potenciales para inseminación artificial ($r=-0.26$; $p=0.0001$), velocidad rectilínea ($r=-0.43$; $p=0.0001$) e índice de linealidad espermática ($r=-0.38$; $p=0.0001$). Al aumentar la osmolaridad, las características antes mencionadas se ven disminuidas. Asimismo, la osmolaridad se correlacionó positivamente con el porcentaje de espermatozoides estáticos ($r=+0.39$; $p=0.0001$). Los espermatozoides aumentan al incrementar la presión osmótica. Estos resultados sugieren que la dilución de conjugados seminales a una solución ligeramente hipertónica, es probable que los espermatozoides pudieran haber sido afectados en cierto grado de estrés osmótico, pero esto no fue probado. El estrés osmótico a nivel celular se da como consecuencia a cambios bruscos en las concentraciones de solutos alrededor de la célula, lo que desencadena movilizaciones rápidas de agua a través de la membrana, pudiendo causar daños a los espermatozoides (Gao, Mazur, & Critser, 1997). Meyers (2005) sostiene que diluyentes hipertónicos afectan a los espermatozoides, debido a los movimientos de agua a través de la membrana plasmática. El estrés osmótico ha mostrado causar daños en la membrana plasmática y alteraciones en el metabolismo espermático y en su calidad (Ball, 2008). Estudios realizados en conejos, han encontrado que la adaptabilidad de la membrana espermática al estrés osmótico está condicionado a mecanismos regulatorios en la distribución y balance electrolítico entre los compartimientos intra y extracelular, y que la composición de la membrana plasmática constituye un factor determinante a la resistencia o tolerancia osmótica (Gloria, Henningb,

Di, & Contric, 2021). Altas concentraciones de solutos desencadenan que el agua fluya dentro de la célula, hasta mantener un equilibrio y los espermatozoides contrarresten el incremento consecuente de volumen, mediante la eliminación de electrolitos (Petrunkina, Jebe, & Töpfer-Petersen, 2005).

Existen pocos estudios realizados con semen fresco de conejo mantenido a 32°C que comparen medios de conservación de corta duración isosmóticos, ligeramente hipertónicos o hipertónicos. No obstante, se han encontrado diferencias entre especies en cuanto a la tolerancia de los espermatozoides a cambios en la osmolaridad. Chang & Thorsteinsson (1958), reportaron que la capacidad fertilizadora de espermatozoides de conejos se ve menos afectada en soluciones hipertónicas que hipotónicas, es decir, que son más tolerantes a las primeras que a las segundas. Alvariño (1993) sostiene que puede haber pérdidas de motilidad transitoria o total con diluyentes hipotónicos o hipertónicos, pero los espermatozoides de conejo son más tolerantes a estos últimos, y que los medios de dilución para preservar semen de conejo deben de presentar presiones osmóticas alrededor de 320 mOsmol/kg⁻¹. Fraser, Gorszczaruk, y Strzezek (2001) demostraron en cerdos, que para que no se vea afectada la viabilidad ni la movilidad espermática se requiere que la osmolaridad se mantenga en un rango de 250 a 290 mOsmol/kg⁻¹, pero para la conservación del semen se pueden manejar hasta 380 mOsmol/kg⁻¹ (Gadea, 2003). En equinos concentraciones de solutos entre 300 y 400 mOsmol/kg⁻¹ son consideradas como adecuadas en diluyentes basados en leche, pero valores óptimos los sitúan en 350 mOsmol/kg⁻¹ (Blanchard et al., 2003). Los espermatozoides de aves mantienen sus capacidades fertilizadoras en diluyentes con osmolaridades que van de 250 hasta 460 mOsmol/kg⁻¹, pero que la presión osmótica recomendada para esta especie es de 325 a 350 mOsmol/kg⁻¹ (Sexton & Fewlass, 1978). De cualquier forma, el semen de conejo ha mostrado ser más sensible a soluciones hipertónicas comparado con otras especies (Castellini et al., 1992).

Los mejores resultados con la SBSF + Gel pudieran ser explicados por su composición química y concentración de solutos, ya que se aproxima a la osmolaridad del semen en esta especie, favoreciendo así la mejor respuesta funcional de los espermatozoides y mejor calidad. Varios estudios están de acuerdo que, para minimizar efectos negativos en el metabolismo y la sobrevivencia espermática, los diluyentes para conservarlos deberán ser aproximadamente isotónicos al semen (Cragle & Salisbury 1959; Foote, 1988; Steinbach & Foote, 1967). La dilución de espermatozoides en soluciones isotónicas les confiere una máxima actividad (Latif, Ijaz, Aleem, & Mahmud, 2005). Las soluciones *buffers* salinas fosfatadas por su contenido en sales y fosfatos, han mostrado actuar como un medio isotónico tampón que balancea la concentración de electrolitos alrededor de las células, previniendo osmosis y manteniendo la concentración de hidrogeniones en el medio, protegiendo la integridad estructural y la viabilidad de las células (Martin et al., 2006). Las concentraciones de KCl en este mismo medio han mostrado mantener la actividad de la bomba sodio/potasio de los espermatozoides y prevenir la depleción del potasio intracelular que puede relacionarse con disminuciones en la movilidad espermática (Alvarez & Storey, 1982). Mientras que la inclusión de NaCl regula la presión osmótica (Levis, 2000) y el fosfato bisódico (Na_2HPO_4) y fosfato mono-potásico (KH_2PO_4) aportan funciones *buffers* eficientemente (Will, Clark, & Swain, 2011).

En este estudio se estimaron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre razas para las características espermáticas y de cinética de movimiento, así como en sus potenciales reproductivos. La calidad de los espermatozoides de conjugados seminales de conejos Nueva Zelanda Blanco diluidos fueron superiores que la de los California. En conejos no se reportan estudios en la literatura sobre la respuesta de los espermatozoides de diferentes razas a variaciones en las composiciones químicas, osmolaridades y tiempos de conservación en diferentes medios. Lake (1983) sostiene que espermatozoides de gallos de varias razas requieren de condiciones diferentes de almacenamiento para preservar su viabilidad y sugiere ajustar los diluyentes a razas individuales.

Sin embargo, se requieren de más estudios en diferentes especies para evaluar los efectos de diferentes diluyentes que varíen en sus composiciones químicas y presiones osmóticas en las características espermáticas en diferentes razas. De cualquier forma, nuestros estudios confirman que la SBSF + Gel presentó menores afectaciones a los espermatozoides conservados, independientemente de las razas utilizadas. Es de esperarse que la función espermática difiera entre genotipos y tipo de diluyente. Estudios realizados en *Drosophila melanogaster* como modelo, encontraron que la viabilidad espermática varía con el tipo de dilución *buffer* y genotipo (Guo, Henke, & Reinhardt, 2021). Sin embargo, hasta lo que hay publicado actualmente, no existen comparaciones para un sistema de modelo genético de como espermatozoides de diferentes genotipos responden a cambios en las composiciones químicas y de osmolaridad de diluyentes *buffers*.

No se observaron cambios significativos en osmolaridades en relación con las horas de conservación, independientemente que los valores de la SBSF_E + Gel fueron siempre superiores comparados con el medio SBSF + Gel. Sin embargo, la motilidad total, motilidad progresiva, velocidad rectilínea, índice de linealidad, número de espermatozoides vivos normales mótils progresivos y el número de dosis mostraron una clara disminución transcurridas las horas de conservación. Estos resultados son consistentes a los reportados por otros autores en espermatozoides de otras especies animales diluidos en medios de conservación (Das, Ahmed, & Deka, 2015; Long & Conn, 2012; Murphy et al., 2018). Se ha demostrado, que la utilización de diferentes diluyentes, temperaturas de conservación y tasas de dilución, los espermatozoides sufren una disminución en su viabilidad, motilidad, además, de cambios en su integración morfológica con el tiempo (Maxwell & Salamon, 1993). Este decremento en la calidad ha sido relacionado a la formación de radicales libres que dañan sus membranas como el ADN mitocondrial y nuclear (Vishwanath & Shannon, 1997), proceso que altera la funcionalidad de los espermatozoides, reduciendo así la sobrevivencia. Decrementos progresivos en la motilidad espermática por tiempo cortos de conservación y cambios en temperaturas han

sido observados en bovinos (Murphy et al., 2018). En gallos la conservación de semen fresco *in vitro* pierde de forma gradual, pero rápida, su viabilidad y motilidad, dando como resultado que su habilidad fertilizadora se vea disminuida, independientemente del tipo de diluyente utilizado (Jafari, Parizadian, & Zamani, 2013). Estudios recientes de laboratorio *in vitro* en humanos, han corroborado que los espermatozoides van perdiendo su vitalidad con el transcurso del tiempo, aproximadamente después de una hora de ser eyaculados como resultado de cambios de osmolaridad, déficit de energía, propagación bacteriana, daño oxidativo y lesiones por decrementos en las temperaturas (Cheng et al., 2022). De acuerdo con estos autores, los espermatozoides son muy sensibles a cambios de presiones osmóticas, afectando su viabilidad y motilidad, y que la falta de energía influye adversamente en los procesos normales de hiperactivación y capacitación espermática. Además, sostienen que el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por el metabolismo de los espermatozoides, por espermatozoides inmaduros y por aquellos muertos ocasionan daños en los ácidos nucleicos, proteínas, y otras biomoléculas estructurales. Igualmente, hacen hincapié, en que la disminución de temperaturas o shock térmico afectan la motilidad espermática y que la susceptibilidad a las bajas temperaturas se correlaciona con la cantidad de lípidos en la membrana espermática. Los principales problemas al conservar células espermáticas son variados, uno de ellos es la pérdida de matriz extracelular, lesiones que provocan que la motilidad espermática sea afectada y que los daños en la membrana y al ADN desencadenen en apoptosis y necrosis de las células espermáticas (Cheng et al., 2022).

Las interacciones entre raza y tipo de diluyente observadas para osmolaridad, inmovilidad, motilidad total, motilidad progresiva sugieren que las respuestas de los conjugados seminales al tipo de diluyente utilizado para estas características espermáticas varían entre razas, y las diferencias observadas están relacionados a cambios de presiones osmóticas. Los conjugados seminales provenientes de semen de conejos Nueva Zelanda Blanco y

California diluidos en SBSF + Gel mostraron osmolaridades isotónicas de 269 y 268 mOsmol/kg⁻¹, respectivamente, con mejoras en la motilidad total y progresiva, además que los porcentajes de espermatozoides estáticos fueron más bajos en las dos razas. En contraposición la dilución con SBSF_E + Gel para conjugados seminales para la primera y segunda raza con osmolaridades de 304.2 y 335.4 mOsmol/kg⁻¹, disminuyeron en cierto grado la motilidad total y progresiva para conjugados de conejos Nueva Zelanda Blanco, pero efectos detrimentales más definitivos se observaron para la raza California, en donde un gran porcentaje de espermatozoides permanecen estáticos, y las motilidades totales y progresivas se vieron disminuidas, particularmente en esta última característica. Estos resultados de interacción soportan la hipótesis que los espermatozoides entre razas responden de forma diferente al tipo de diluyente y que existen diferencias de tolerancia al estrés osmótico. Futuras investigaciones se deberán enfocar en encontrar medios de conservación, tanto de corta como de larga duración, que mejor se adapten a diferentes razas para incrementar la eficiencia de conservación espermática y su calidad.

Fase 2 de campo

La fase de campo fue posible llevarla a cabo sólo en conejas Nueva Zelanda Blanco. En respuesta a cambios de lugar ocho horas antes de la inseminación artificial como bioestímulo, 87.5 % de las conejas fueron receptivas y las tazas promedias de partos y número de gazapos nacidos totales fueron 85 % y 7.3 gazapos, respectivamente. Estos resultados para la tasa de partos son inferiores en 9% (78.0%), pero similares a los 7.6 gazapos nacidos totales reportados en conejas no lactando multíparas locales Nueva Zelanda Blanco bajo condiciones similares medio ambientales (Rodríguez-De Lara et al., 2007). No se encontraron efectos ($p>0.05$) del tipo de diluyente en la tasa de partos y en el número de gazapos nacidos totales y vivos al haber inseminado en similares condiciones 0.8 mL de dosis por coneja, tomados de los conjugados seminales contenidos en los tubos de dilución. La tendencia a la disminución de los tamaños de camadas al parto observadas cuando la inseminación es

realizada a la hora 0 de conservación comparada con la hora 3 se explica por la disminución en las concentraciones de espermatozoides vivos normales móviles progresivos en las dosis seminales. Al observar el comportamiento de la calidad seminal en los estudios *in vitro* durante el transcurso de los tiempos de conservación, se observó que la viabilidad espermática disminuía. Sin embargo, estos resultados demuestran que independientemente de los cambios en las osmolaridades y las diferencias observadas *in vitro* en favor de la SBSF + Gel en las calidades espermáticas entre tipos de diluyentes, ambos diluyentes mantenidos a 32 °C durante las 3 horas de conservación dieron resultados de comportamiento similares. Estudios realizados en conejas California inseminadas artificialmente con 20×10^6 espermatozoides en la dosis seminal por coneja con la misma solución *buffer* salina enriquecida SBSF_E + Gel dentro de la primera hora después de la colección de semen (Velasco &Tello, 2016), no encontraron diferencias en las tasas de partos y tamaños de camada al parto comparados con un diluyente comercial gelificado (Cunigel). Las tasas de partos para los dos diluyentes fueron de 0.72 ± 0.06 y 0.67 ± 0.05 y los tamaños de camada al parto de 7.7 ± 0.31 y 7.9 ± 0.32 , respectivamente.

3.5 Conclusiones

Uno de los aspectos importantes derivado de esta investigación fue la validación de dos diluyentes de corta duración basados en soluciones *buffers* salinas fosfatadas estándar y enriquecidas adicionadas con gel, en donde se probaron sus efectividades *in vitro* basados en análisis seminales asistidos el CASA, e *in vivo* mediante pruebas de comportamiento reproductivo en conejas inseminadas artificialmente.

El tipo de diluyente, la raza y las horas de conservación afectaron gran parte de las características de calidad espermática evaluadas. Los estudios *in vitro* confirman que la dilución de semen en una solución *buffer* salina fosfatada estándar adicionada con gel mejora significativamente las calidades espermáticas comparada con la misma fórmula enriquecida, lo que aumenta significativamente las concentraciones de espermatozoides vivos normales

móviles progresivos por volumen del conjugado seminal y el número de dosis potenciales para uso en inseminación artificial. Estos resultados demuestran estar estrechamente relacionados a diferencias de presiones osmóticas entre los dos diluyentes de prueba.

Las mejores calidades espermáticas se obtienen de conjugados seminales diluidos provenientes de conejos Nueva Zelanda Blanco que de California. Las interacciones entre tipo de diluyente y raza observadas en las características de movilidad espermática demuestran que los espermatozoides de Nueva Zelanda Blanco y California responden diferente a medios de conservación, lo que sugiere ajustar tipos de diluyentes a razas específicas. Por lo anterior, las investigaciones futuras deberán de enfocarse en encontrar medios de conservación, tanto de corta como de larga duración, que mejor se adapten a diferentes razas para incrementar la eficiencia de conservación y preservar la calidad espermática.

La dilución de conjugados seminales con la solución *buffer* salina fosfatada estándar adicionada con gel permite obtener una mayor cantidad de dosis que la misma solución enriquecida, lo que incrementa la eficiencia de procesamiento en el laboratorio. Sin embargo, el comportamiento reproductivo utilizando dosis de conjugados seminales diluidos en los dos medios de conservación y mantenidos a 32 °C no difieren cuando la inseminación artificial es realizada dentro las primeras tres horas después de la colección y dilución. Se recomienda que la IA con semen diluido con los dos tipos de diluyente se realicen dentro de la primera hora para obtener los mejores resultados.

Los resultados del presente estudio también sugieren que estos diluyentes pueden ser comercializados, contribuyendo al desarrollo tecnológico de la cunicultura nacional; además, es importante mencionar que los diluyentes son de invención local, y no hay registro de diluyentes de uso comercial en México por lo que los resultados de este estudio pretenden ser un referente para el desarrollo, validación y mejoramiento de diluyentes para la especie cunícola. Se requiere de investigaciones para desarrollar localmente diluyentes que permitan

conservar el semen por lapsos mayores de tiempo a temperatura ambiente, para facilitar el transporte de dosis seminales a diferentes regiones del país y desarrollar diluyentes que mejor se adapten a la tolerancia osmótica para razas individuales.

3.6 Literatura citada

- Albiaty, N. M., Alobaidi, H. J., Kareem, A. F., AlHakim, A. M., Alnaeb, A. Y., & Alkhazraji, A. A. (2016). Effect of extenders and preservation periods in some semen characteristics of Awassi rams. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 234-243.
- Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1982). Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: Its effect on sperm motility. *Biology of Reproduction*, 27(5), 1102-1108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1102>
- Alvariño, M. R. (1993). Control de la Reproducción en el Conejo, España: Mundi Prensa. Primera edición, Madrid, España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación –IRYDA. 137 p. <https://www.mundiprensa.mx/catalogo/9788471144485/control-de-la-reproduccion-en-el-conejo>.
- Arando, A., Delgado, J. V., Fernández-Prior, A., León, J. M., Bermúdez-Oria, A., Nogales, S., & Pérez-Marín, C. C. (2019). Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*, 86, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.002>
- Aurich, C. (2011). Semen extenders for cooled semen Equine reproduction (2th ed). United States: Chichester: Wiley-Blackwell, p. 1336-1340.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P., & Rigby, S. L. (2003). Semen Preservation. *Manual of Equine Reproduction* (Second Edition), 165-177. <https://doi.org/10.1016/B0-32-301713-4/50015-7>
- Castellini, C., Battaglini, M., Lattaioli, P. (1992). Effects of cryoprotectants and freezing on rabbit semen quality. *Journal of Applied Rabbit Research*, 15, 431-438.

- Chang, M. C., & Thorsteinsson, T. (1958). Effects of osmotic pressure and hydrogen-ion concentration on the motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 9(6), 510–520. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)33242-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)33242-3)
- Cheng, Q., Li, L., Jiang, M., Liu, B., Xian, Y., Liu, S., Liu, X., Zhao, W., & Li, F. (2022). Extend the survival of human sperm *in vitro* in non-freezing conditions: Damage mechanisms, preservation technologies, and clinical applications. *Cells*, 11(18). <https://doi.org/10.3390/cells11182845>
- Constantini, D. (1989). Inseminación artificial: sistemas de conservación de esperma. *Cuniculture*, 86,100-103.
- Cragle, R., & Salisbury, G. (1959). Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. IV. pH, osmotic pressure, and the cations, sodium, potassium, and calcium. *Journal of Dairy Science*, 42(8), 1304-1313. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(59\)90734-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90734-9)
- Das, K. K., Ahmed, k., & Deka, N. (2015). Effect of different extenders on the quality of poultry semen during preservation at 4 - 50 C. *Poultry Science Association*, 7(01), 105–107.
- Fallas, M. L. (2016). El uso de extracto de 6-methoxi-2-benzoxazoline como bioestímulo reproductivo en conejos. Tesis de Doctorado. Colegio de postgraduados. Montecillo, Texcoco de Mora, México.
- Foote, R. H. (1988). Preservation and fertility prediction of spermatozoa. *11th International Congress in Animal Reproduction Artificial Insemination*, 5, 126-134.
- Fraser, L., Gorszczaruk, K., & Strzezek, J. (2001). Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(6), 325–329. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00310.x>
- Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish. *Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17-27. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Gadella, B. M., & Evans, J. P. (2011). Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 713, 65–80. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4_5.
- Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and

- sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49(1), 112–123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.112>
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction* (Oxford, England), 10(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
- Gao, D., Mazur, P., & Critser, J. K. (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. *Reproductive Tissue Banking*, 263–328. <https://doi.org/10.1016/B978-012399770-8/50007-1>
- Gloria, A., Henningb, H., Di, L., & Contric, A. (2021). Osmotic tolerance of rabbit spermatozoa is affected by extender composition and temperature. *Animal Reproduction Science*, 229, 106763. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106763>
- Guo, R., Henke, A. L., & Reinhardt, K. (2021). Sperm viability varies with buffer and genotype in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1080/19336934.2020.1837592>
- Jafari, A.Y., Parizadian, B., & Zamani, M. (2013). The impact of organic selenium supplementation on rooster semen quality in liquid condition. *Poultry Science Journal*, 1(1), 23-31.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 165-172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Lake, P. (1983). Factors affecting the fertility level in poultry, with special reference to artificial insemination. *World's Poultry Science Journal*, 39(2), 106-117. doi:10.1079/WPS19830011
- Latif, A., Ijaz, A., Aleem, M. & Mahmud, A. (2005). Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm. *Pakistan Veterinary Journal*, 25(4), 179-182.
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara F., Viudes de Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64, 1130–1141.
- Levis, D. (2000). Liquid boar semen production: Current extender technology and where do we go from here. In: Semen boar

preservation IV (L. A. Johnson and H.D. Guthrie, eds.). *Allen Press, Inc. Lawrence, KS*, pp. 121-128.

- Long, J. A., & Conn, T. L. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 °C for 24 hours. *Poultry Science*, 91(8), 1990–1996. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>
- Mara, L., Dattena, M., Pilichi, S., Sanna, D., Branca, A., & Cappai, P. (2007). Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science*, 102(1-2), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.007>
- Martin, N. C., Pilie, A. A., Ford, L. V., Callaghan, C. L., McTurck, K., Luly, D., & Scrimgel, D. G. (2006). The use of phosphate buffered saline for the recovery of cell and spermatozoa from swabs. *Science and Justice*, 46 (3), 179-184.
- Maxwell, W. M., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: A review. *Reproduction, Fertility, and Development*, 5(6), 613–638. <https://doi.org/10.1071/rd9930613>
- Meyers, S. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.026>
- Murphy, E. M., Kelly, A. K., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science*, 96(6), 2408-2418.
- Petrunkina, A. M., Jebe, E., & Töpfer-Petersen, E. (2005). Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), 508-521. <https://doi.org/10.1002/jcp.20317>
- Rizkallah, N., Chambers, C. G., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2022). Factors affecting the survival of ram spermatozoa during liquid storage and options for improvement. *Animals*, 12(3), 244. <https://doi.org/10.3390/ani12030244>.
- Robayo, I., Montenegro, V., Valdés, C., & Cox, J. F. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4), 393–399. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00920.x>

- Rodríguez-De Lara, R. (1996). Recomendación práctica de una técnica de inseminación artificial aplicada a granjas comerciales. In XXI Symposium de Cunicultura. Amposta, España, 4.
<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-RecomendacionPracticaDeUnaTecnicaDeInseminacionArt-2882109.pdf>
- Rodríguez-De Lara, R., Fallas-López, M. (1999). Environmental and physiological factors influencing kindling rates and litter size at birth in artificially inseminated doe rabbits. *World Rabbit Science*, 7, 191-196.
- Rodríguez-De Lara, R., Herrera-Corredor, C. A., Fallas-López, M., Rangel-Santos, R., Mariscal-Aguayo, V., Martínez-Hernández, P. A., & García-Muñiz, J. G. (2007). Influence of supplemental dietary sprouted wheat on reproduction in artificially inseminated doe rabbits. *Animal Reproduction Science*, 99, 145-155.
- Rosato, M. P., Rebollar, P.G., Laffaldano, N. (2006). Comparación de diferentes diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su conservación. *XXXI Symposium de Cunicultura*, Lorca, España, 9-13.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77–111.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salisbury, G.W., & Nakabayashi, N.T. (1957). The effect of phosphate and chloride ions on aerobic metabolism of bovine spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 34, 52-59.
- SAS. (2016). SAS/STAT User's guide. (Release 9.1) SAS Publishing, Cary (NC), 1-7, 5180.
- Sexton, T. J., & Fewlass, T. A. (1978). A new poultry semen extender 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5 degrees C. *Poultry Science*, 57(1), 277–284. <https://doi.org/10.3382/ps.0570277>
- Siudzińska, A., & Lukaszewicz, E. (2008). Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *The Journal of Applied Poultry Research*, 17(1), 101–108. doi:10.3382/japr.2007-00048.
- Soliman, F., & El-Sabrou, K. (2020). Artificial insemination in rabbits: Factors that interfere in assessing its results. *Journal of Animal Behavior Biometeorology*, 8, 120-130.

- Steinbach, J., & Foote, R. (1967). Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 50(2), 205-213. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87389-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87389-2)
- Velasco, S., & Tello, C. (2016). Eficiencia reproductiva de conejas inseminadas artificialmente con semen fresco diluido en una solución buffer salina fosfatada enriquecida adicionada con gel. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Estado de México).
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (1997). Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility, and Development*, 9(3), 321–331. <https://doi.org/10.1071/r96088>
- Walton, A. (1945). Notes on the technique of artificial insemination. The Holborn Surgical Instrument Co Ltd, London.
- Will A. M., Clark A. N., & Swain E. J. (2011). Biological pH buffers in IVF: Help or hindrance to success. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(8), 711-724.

4. APÉNDICES

Apéndice 1. Configuración del sistema CASA.

Límites de análisis	Valor
Porcentaje mínimo de motilidad	0
Porcentaje mínimo de motilidad progresiva	0
Calibración	
Objetivo	Zeiss 10x CM-040GE:
Magnificación del objetivo X	1.2
Magnificación del objetivo Y	1.2
Cámara	
Exposición (Ms)	16
Integrado habilitado	Verdadero
Tiempo integrado	1000
Detección de células	
Elongación máxima (%)	100
Elongación mínima (%)	1
Mínimo brillo de la cabeza espermática	153
Tamaño máximo de la cabeza	91
Tamaño mínimo de la cabeza	4
Filtro estático de la cabeza	Falso
Brillo mínimo de la cola	255
Desplazamiento automático del brillo mínimo de la cola	10
Modo de brillo mínimo de la cola	Manual
Cámara espermática	
Correcciones capilares	1.3
Profundidad de la cámara (µm)	20
Tipo de cámara	Capilaridad
Iluminación	
Tipo de iluminación	Fluorescencia
Intensidad de la fluorescencia	3996
Intensidad visible	2953
Fotómetro máximo	90
Fotómetro mínimo	70

Apéndice 2 Configuración del sistema CASA para cinemática de movimiento espermático.

Cinemática	Ajuste
Índice de rectitud (STR) progresiva (%)	80
Velocidad promedio de trayectoria (VAP) progresiva ($\mu\text{m/s}$)	50
VAP lento ($\mu\text{m/s}$)	20
Velocidad rectilínea (VSL) lenta ($\mu\text{m/s}$)	30
Algoritmo estático	Largo
VAP estático ($\mu\text{m/s}$)	4
VSL estático ($\mu\text{m/s}$)	1
Multiplicador de ancho estático	0.5
Morfología	
Intervalo de confianza del Reflejo de la pieza media distal (DMR) (%)	25
DMR Máximo de la gota a la cola (μm)	5
DMR Longitud máxima de la cola (μm)	20
Intervalo de confianza de las gotas (%)	20
Distancia mínima de gota distal (μm)	4
Largo de la cabeza gota proximal (μm)	10.5
Largo mínimo de la cola (μm)	0
Largo promedio angular de la cola doblada	5
Tasa mínima de doblamiento angular	5
Intervalo de confianza de las colas dobladas (%)	50
Angulo mínimo de la cola enrollada ($^{\circ}$)	180
Intervalo de confianza de la cola enrollada (%)	50
Intervalo de confianza de la cola (%)	75
Estado	
Estado de temperatura	37
Categoría Viadent	
Esperma viable fluorescencia	Viable
Captura de video	
Velocidad del marco de captura (Hz)	1
Conteo del marco	30