



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN

Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN DE HEMBRAS
EN EL TIEMPO DE REACCIÓN Y CALIDAD DE SEMEN
DE CONEJOS CALIFORNIA

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

RAÚL JAVIER ARONÉS QUISPE

Bajo la supervisión de: RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA, Ph.D.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
CENTRO DE SERVICIOS ESCOLARES
ACTIVA DE EXÁMENES PROFESIONALES

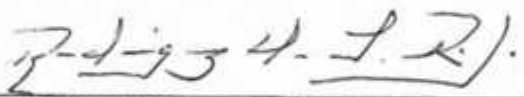
Abril 2016

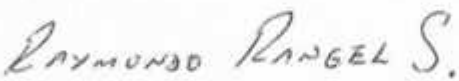
Chapingo, estado de México

INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN DE HEMBRAS EN EL TIEMPO DE REACCIÓN Y CALIDAD DE SEMEN DE CONEJOS CALIFORNIA

Tesis realizada por **RAÚL JAVIER ARONÉS QUISPE** bajo la dirección del Dr. Raymundo Rodríguez De Lara y 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: 
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 
DR. DEMETRIO AMBRIZ GARCÍA

ASESOR: 
DR. JOSÉ ARTEMIO CADENA MENESES

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIAS	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos reproductivos del conejo.....	4
2.1.1 Comportamiento sexual del conejo.....	6
2.1.2 El semen.....	9
2.1.3 El espermatozoide	11
2.1.4 La exposición de hembras y su relación con la calidad seminal	16
2.2 Métodos de evaluación seminal	17
2.2.1 Evaluación del semen utilizando el sistema CASA.....	25
2.3 Literatura citada.....	33
3 COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL CONEJO EXPUESTO A HEMBRAS DE LA RAZA CALIFORNIA.....	41
3.1 Resumen.....	41
3.2 Abstract.....	42
3.3 Introducción.....	42

3.4	Materiales y métodos	43
3.4.1	Localización	43
3.4.2	Animales, tratamientos y diseño experimental.....	44
3.4.3	Instalaciones y ambiente.....	44
3.4.4	Manejo alimenticio	44
3.4.5	Tiempo de reacción y colección de semen	45
3.4.6	Viabilidad espermática.....	45
3.4.7	Morfología, concentración, motilidad y cinética espermática	46
3.4.8	Dosis de semen	47
3.4.9	Variables de respuesta	48
3.4.10	Análisis estadístico	49
3.5	Resultados y discusión.....	50
3.6	Conclusión	56
3.7	Agradecimiento	56
3.8	Literatura citada.....	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comportamiento reproductivo, características seminales, características espermáticas y dosis de eyaculado en trabajos realizados en conejos Nueva Zelanda, México.	20
Cuadro 2. Variables de cinética de los espermatozoides a evaluar.....	28
Cuadro 3. Características seminales y espermáticas de trabajos realizados en Europa con conejos de la raza Nueva Zelanda utilizando sistemas asistidos por computadora.	29
Cuadro 4. Características seminales y espermáticas de trabajos realizados en Europa con conejos híbridos-Nueva Zelanda utilizando sistemas asistidos por computadora.	30
Cuadro 5. Estadísticos descriptivos del peso vivo, tiempo de reacción, características seminales y espermáticas.....	51
Cuadro 6. Medias ^z ($\pm$ error estándar) para el efecto de exposición de hembras y orden de eyaculado en el tiempo de reacción, características seminales y espermáticas.....	52
Cuadro 7. Medias ^z ($\pm$ error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculado sobre la motilidad total.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un espermatozoide.	13
Figura 2. Anormalidades en espermatozoides de conejo.	24
Figura 3. Cámara de Leja® usada en sistemas CASA.	47
Figura 4. Equipo analizador de semen asistido por computadora (CASA).	47
Figura 5. Iluminación interactiva de los espermatozoides para la diferenciación de la cabeza y cola.	48
Figura 6. Determinación de la movilidad espermática en el equipo CASA.	48
Figura 7. Influencia de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculado sobre la motilidad total.	55

DEDICATORIAS

A mis padres, Teodoro y Paulina.

A todos los estudiantes, técnicos, egresados y profesionistas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga del departamento de Ayacucho, Perú.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, a los profesores, técnicos y administrativos, por brindarme la formación académica y las facilidades para los estudios y el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por asignar los recursos económicos para la realización de los estudios de maestría.

A los profesores, Dr. Raymundo Rodríguez De Lara, Dr. Raymundo Rangel Santos, Dr. Demetrio Alonso Ambriz García y Dr. José Artemio Cadena Meneses, por su asesoría en el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Dr. Raymundo Rodríguez De Lara y a la M. C. Marianella Fallas López, investigadores de “Conejos”, Centro de Investigación Científica del Estado de México A. C., por haber brindado las condiciones necesarias para la realización del trabajo de campo y de laboratorio.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero, responsable del Laboratorio y al personal técnico de Microbiología del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, por otorgarme las facilidades para el análisis de tinciones espermáticas.

A Edith Marleni Villarreal Molero, mi compañera de toda la vida, por su apoyo incondicional y permanente en el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos generales

Nombre: Raúl Javier Aronés Quispe

Fecha de nacimiento: 02 de mayo de 1971

Lugar de Nacimiento: Ayacucho, Perú

Pasaporte: 5778999

CURP: AOQR710502HNERSL09

Profesión: Ingeniero Agrónomo

Desarrollo académico

Bachillerato: Universidad de Huamanga. Ayacucho, Perú.

Licenciatura: Universidad de Huamanga. Ayacucho, Perú.

Maestría: Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, estado de México.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Las técnicas más comunes en la reproducción asistida son la obtención de semen y la inseminación artificial. Éstas técnicas son claves para intensificar la reproducción y lograr mayor producción de conejos (Herrera *et al.*, 2013). En México, sólo el 30% de la producción cunícola utiliza sistemas semi-intensivos, el resto es de tipo familiar (Mendoza, 2007).

La obtención de semen tiene que ver con la eyaculación, ésta es una respuesta altamente organizada a estímulos sensoriales e involucra muchos órganos y sistemas, incluidos el somático y el sistema nervioso autónomo. La evaluación de la fertilidad del conejo es importante en la producción cunícola. Con la finalidad de mejorar la respuesta reproductiva y reducir los costos de crianza, se han aplicado diversas técnicas y métodos relacionados con la libido y el estro; así Theau-Clément *et al.* (1998), notaron que la bioestimulación es un procedimiento de fácil aplicación, es económico, no afecta la salud y tiende a mejorar la productividad del animal. Posteriormente, Rodríguez-De Lara *et al.* (2003), demostraron que la exposición de las hembras a los machos es una forma de bioestimulación que intensifica el deseo sexual, la producción y calidad de semen de los conejos.

Los efectos positivos de la bioestimulación en la fertilidad se pueden observar tanto en la hembra como en el macho. Fuentes *et al.* (2004), observaron que reduce el tiempo de respuesta para la eyaculación en el macho; así mismo, Dehnhard (2011), menciona que el estímulo olfativo podría mejorar la capacidad reproductiva de las hembras acelerando la madurez sexual, inducir la ovulación y reducir el anestro posparto y el apareamiento.

El interés por evaluar la fertilidad en el caso del macho motivó diversos estudios en la calidad del semen. Nizza *et al.* (2002), determinaron que el número adecuado de eyaculaciones obtenidas por día es de dos; Villagran *et al.* (2003), encontraron que la mejor edad de los machos para producir el mayor número de eyaculaciones antes del agotamiento sexual o rechazo a la hembra se da entre

los seis y doce meses. La IRRG (2005), consolidó los avances obtenidos, identificando los factores principales que influyen en la calidad del semen tales como: la frecuencia de colección, los programas de luz, la edad y salud del macho, y las estrategias de alimentación. Estos factores continuaron siendo estudiados desde varias perspectivas. Lavara *et al.* (2005), observaron que la motilidad combinada con el análisis morfológico pueden proveer información sobre fertilización del espermatozoide. Castellini *et al.* (2006), confirmaron que el incremento en el ritmo de recolección disminuye la concentración y producción de espermatozoides. Con relación al estudio de la estacionalidad, Saffa *et al.* (2008), observaron que las características seminales resultaron mejor en invierno que en verano; asimismo, Schneidgenová *et al.* (2011), estudiaron el efecto estacional en la fertilidad de los conejos recomendando su monitoreo durante todo el año según las estaciones.

La mayor parte de la información consultada sobre el tiempo de reacción y calidad de semen corresponde a la raza Nueva Zelanda. Sin embargo, los programas de mejora genética en las granjas comerciales también requieren contar con datos correspondientes a las razas California y Chinchilla. La importancia de la raza California radica en que a pesar de ser más pequeña que la Nueva Zelanda, tiende a tener una mejor proporción de carne:hueso (McNitt *et al.*, 2013). En ese sentido, con la finalidad de generar información sobre el comportamiento reproductivo de conejos de la raza California, el presente trabajo considera que la influencia de la exposición de la hembra al macho California, estimula su libido que se manifiesta a través del tiempo de reacción y la producción y calidad de semen, la misma que tiene que ver con el número de dosis que se obtenga para realizar la inseminación artificial.

1.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de la exposición de hembras en el tiempo de reacción y la calidad del semen en conejos de la raza California.

1.2 Objetivos específicos

1. Determinar la influencia de la exposición de la hembra en el comportamiento sexual del macho a través del tiempo de reacción.
2. Determinar el efecto de la exposición de la hembra en la calidad del semen a través del volumen de eyaculado, pH y concentración espermática.
3. Evaluar el efecto de la exposición de la hembra en la calidad del semen a través de características de viabilidad, movimiento, anormalidades y variables cinéticas del espermatozoide que determinan el número de dosis de semen obtenido para inseminación artificial.

1.3 Hipótesis

La exposición de la hembra tiene influencia en la libido del macho, las características seminales, características de los espermatozoides y en el número de dosis obtenido para inseminación artificial.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

Los conejos comunes (*Oryctolagus cuniculus*) son animales prolíficos (una hembra puede tener hasta 30 descendientes en un periodo reproductivo), gregarios, con estructura social y de costumbres preferentemente crepusculares (Padilla y Cuesta, 2003).

Las razas livianas más comunes son la Nueva Zelanda, California y Chinchilla. La raza California es segunda en importancia en la cunicultura industrial (línea macho). Posee el fenotipo “himalaya” blanco con extremos negros en el hocico, orejas, patas y cola, dependiendo su manifestación de la temperatura fría. Su peso vivo varía de 3.5 a 4.5 kg, es más rústica que la raza Nueva Zelanda, algo nerviosa en temperamento, pero de buenas características maternas y canal de calidad (Sañudo, 2011). El peso ideal de los machos California es de 4.1 kg (McNitt *et al.*, 2013).

2.1 Aspectos reproductivos del conejo

La coneja presenta ovulación inducida, ésta ocurre aproximadamente 9 a 12 horas después del apareamiento. Así, será receptiva por periodos de 7 a 10 días y no lo será 1 a 2 días después. La receptividad se manifiesta por una vulva roja hinchada, por el roce de la barbilla, por su postura de pie para el montaje y su inquietud. Cuando el color de la vulva presenta una coloración normal es decir pálida, se logra aproximadamente un 35% en la tasa de concepción; con el color rosa, 55%; con el rojo (óptimo), 75%, y con el color rojo oscuro, 40% (Easson, 2001).

Holt y Fazeli (2016), mencionan que la selección de espermatozoides en el sistema reproductor de la hembra está mediada por múltiples factores, incluyendo características físicas del fluido viscoso variable en la que están suspendidos los espermatozoides y los componentes bioquímicos contenidos. Por otra parte, los espermatozoides y las células epiteliales adyacentes interactúan estimulando la expresión génica y cambios bioquímicos en el entorno.

Esto puede dar lugar a efectos sobre el comportamiento de algunas subpoblaciones espermáticas que no llegan hasta los ovocitos.

La función espermátogénica y androgénica de los testículos se puede evaluar a través de la concentración, motilidad y morfología espermática (Rivera-Montes *et al.*, 2013).

Se ha observado que cuando se aplican técnicas como la inseminación artificial, el comportamiento reproductivo del macho se ve limitado. Este comportamiento se puede observar a través de características fisiológicas; así por ejemplo, se puede incrementar la actividad secretora de las glándulas anexas que continúa hasta el año de edad dando lugar a una disminución de la concentración espermática. Asimismo, la espermátogénesis en el macho adulto tiene una duración de 38 a 41 días; en este proceso, una espermátogonia produce 16 espermátocitos primarios, de los cuales se obtiene una media de 3.1 espermátidas por cada uno. De esta manera, se estima una producción diaria en 30 a 40 millones de espermatozoides por gramo de testículo; es decir, un total diario de 50 a 250 millones, con variaciones estacionales (Alvariño, 1993) y raciales, según la edad y la nutrición (McNitt *et al.*, 2013).

Es común que la colección de eyaculado se realice dos veces al día, éstos permiten recuperar aproximadamente el 60% de los espermatozoides producidos. Durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides sufren un proceso de maduración (reducción del acrosoma, desaparición de gotas citoplasmáticas) que les permite adquirir motilidad y capacidad de fecundación debido a las secreciones del epidídimo. Así, las reservas espermáticas totales alcanzan 1,299 millones de espermatozoides. Con un fotoperiodo constante de 16 horas de luz, la reserva total puede aumentar a 1,750 millones de espermatozoides, mientras que cuando disminuye a 12 y 8 horas diarias de luz, aumenta a 2,500 millones (Alvariño, 1993).

2.1.1 Comportamiento sexual del conejo

El estudio de la conducta es un proceso constante que se compone de pautas o regularidades. Una unidad de conducta es una clase de segmento que tiene una duración variable. Según la duración, los segmentos conductuales se pueden clasificar en eventos y estados (Quera y Losada, 2014).

La conducta sexual inicia con la búsqueda de pareja, incluye comportamientos pre y poscopulatorios y termina con la fecundación. Generalmente presenta tres estadios sucesivos: la atracción sexual, las conductas apetitivas o de cortejo y el apareamiento (Collodell *et al.*, 2012). El comportamiento de cópula para Orihuela (2014), es el resultado de varias unidades conductuales que abarcan desde la identificación de la hembra, el cortejo hasta la eyaculación. Este comportamiento puede verse afectado por condiciones ambientales como la dominancia o la presencia de hembras en celo entre otros.

En otras especies, se ha encontrado que ciertas conductas no son exclusivas en el macho. Carneros con baja concentración sérica de testosterona, prefieren montar machos en lugar de hembras (Roselli *et al.*, 2012).

Los lagomorfos se comunican a través de olores (producidos por glándulas de secreción y marcaje urinario) y los utilizan para la identificación de otros individuos, para conocer el estatus social o detectar el estro en las hembras. Estos aromas son secretados por glándulas localizadas en las mejillas, normalmente lo utilizan para demarcar el territorio, conducta reducida en cautividad. Las feromonas pueden influir en la tasa de reproducción (Jensen, 2004). Anatómica y fisiológicamente, los grupos de animales dentro de una misma especie no son similares sobretodo en condiciones de estado silvestre. Ambriz *et al.* (2003), estudiaron el aparato reproductor de tres especies de lagomorfos: *Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus* y encontraron que la masa testicular no estuvo relacionada con la masa corporal, pero fue mayor en *L. californicus* y *R. diazi* que en *O. cuniculus*; asimismo, hubo

más espermatozoides en la cola del epidídimo en *L. californicus* que en *R. diazi* o en *O. cuniculus*.

La mayoría de los conejos se aparean unos segundos después de que se introduce una hembra en su jaula. La monta va acompañada de intensas vibraciones de la pelvis y, después, si la hembra está en celo, ocurre el coito. El fenómeno total de la cópula dura entre 5 y 300 segundos con un promedio de 70 (Alvariño, 1993). El apareamiento puede confirmarse mediante la presencia de un tapón vaginal constituido por las secreciones de las glándulas accesorias del macho durante el eyaculado que impide la salida del semen de la vagina y el útero durante 6 a 24 horas (Jensen, 2004).

La libido o instinto sexual se determina genéticamente; sin embargo, muchos factores ambientales pueden afectar o modificar el comportamiento sexual. Entre éstos se pueden destacar la nutrición, la edad, las prácticas de manejo y factores físicos. La determinación de la libido puede ser realizada de diferentes maneras, especialmente basadas normalmente en el número de montas efectuadas en un determinado periodo. La simple manifestación del deseo sexual no es suficiente para el depósito del semen en la vagina, también es importante la habilidad de monta (Galina y Valencia, 2012).

El comportamiento sexual parece estar asociado al volumen del eyaculado y concentración espermática. Los animales más agresivos tienen un mayor volumen, una menor concentración y un menor porcentaje de espermatozoides vivos (Alvariño, 1993). Los machos pueden copular hasta 22 veces durante 4 horas seguidas para finalmente quedar exhaustos entre los 2 y 15 días posteriores de iniciado el hecho (Jiménez *et al.*, 2012).

Otros aspectos como el comportamiento social fueron estudiados en otras especies. El aislamiento físico de bovinos machos hace que éstos no aprendan lecciones y se convierten en socialmente desinhibidos. El aislamiento social es antinatural para las especies sociales y puede llevar a temperamentos no deseados. En el macho porcino, tiene otro efecto y se manifiesta como la

incompetencia sexual; asimismo, el desempeño no mejora con la edad ni con la experiencia social hasta por seis meses (Price y Orihuela, 2010).

El componente motivacional de la conducta sexual es conocido también como la libido. El componente del desempeño está basado tanto en la libido como en patrones motores que caracterizan cada conducta sexual. Por tanto, la capacidad de servicio está basada en la motivación sexual y en la habilidad para ejecutar patrones motores asociados con la cópula. Así, los toros espectadores lograron un 87% más de montas completas (eyaculaciones) que cuando se evaluaron como controles (Price y Orihuela, 2010).

Para evaluar los problemas en el comportamiento entonces, es necesario tener presente que el componente motivacional y el de ejecución, la libido y los patrones motores son los componentes del comportamiento. La frecuencia, duración o intensidad de la mayoría de las conductas sexuales del macho son posibles de cuantificarlas, pero al hacerlo se mide la ejecución y no sólo la libido. Un animal con baja capacidad de servicio, no necesariamente carece de libido. La razón puede estar en problemas de locomoción (patas débiles), condiciones patológicas, anormalidades en los genitales, o falta de experiencia sexual. El tiempo de reacción y la prueba de saciedad, son relevantes para la evaluación de machos destinados a la colección de semen o situaciones de monta controlada. La prueba de tiempo de reacción consiste en registrar el tiempo que toma al macho desde que entra al corral de evaluación, hasta que logre la primera eyaculación. Esta medida es un buen estimador de la libido. La prueba de saciedad, considera el número máximo de servicios en una hembra determinada (Orihuela, 2014).

La eficiencia de un programa de colección de semen depende del hecho de mantener una libido adecuada. Las montas falsas incrementan la cantidad de semen y esperma. Cuando se usa la vagina artificial, el macho asocia el sitio de colección y el equipo con una experiencia recompensante y montará el maniquí rutinariamente para ser colectado (Price y Orihuela, 2010; Galina y Valencia, 2012).

2.1.2 El semen

El semen es una mezcla de espermatozoides suspendidos en un medio líquido secretado por el epidídimo y por varias glándulas localizadas en diferentes lugares, los cuales son combinados en el momento de la eyaculación (IRRG, 2005). El semen se descompone por centrifugación en plasma seminal y espermatozoides. El plasma seminal es un líquido traslúcido, blanquecino y viscoso, rico en fructosa, ácido cítrico, contiene también otros carbohidratos, proteínas, iones y pequeñas gotas de grasa (Alvariño, 1993).

Las vesículas membranosas (exosomas) del plasma seminal de los mamíferos, poseen un alto contenido de colesterol, esfingomielina y una composición de proteína compleja. La transferencia de proteínas de los exosomas y su capacidad para bloquear el flujo de colesterol de los espermatozoides, ha sido demostrada con la actividad de aminopeptidasas; mientras que la inhibición de características que dependen de la capacitación espermática, sugiere una función estabilizadora de los exosomas en el semen porcino (Piehl *et al.*, 2013).

Castellini *et al.* (2013), mencionan que el plasma contiene gránulos prostáticos, los cuales tienen roles específicos en la sincronización de la capacitación espermática y en la accesibilidad del espermatozoide con relación al óvulo.

El volumen del eyaculado varía desde 0.3 a 6 mL, en función de la secreción de las glándulas anexas (gel). El volumen aumenta en función a la edad del animal y disminuye con el número de colectas (Alvariño, 1993). McNitt *et al.* (2013), mencionan que en conejos adultos de la raza Nueva Zelanda, el volumen varía de 0.4 a 1.5 mL con un promedio de 0.7 mL.

El número de espermatozoides en el eyaculado depende de la raza, la frecuencia de uso y el nivel de estimulación. Puede haber ciclos cortos de tres a ocho días de duración en algunas características seminales como la concentración espermática (Alvariño, 1993; McNitt *et al.*, 2013). La concentración espermática puede situarse entre 50 y 500 millones de espermatozoides por mL, pero normalmente se encuentra entre 150 y 350 millones. La concentración

espermática aumenta de la primera a la segunda colecta para disminuir después (Alvariño, 1993). En conejos de la raza Nueva Zelanda, la producción de espermatozoides se incrementó en machos cuya edades se encontraron entre la vigésima y la trigésima primera semana (McNitt *et al.*, 2013).

El pH medido después de la colecta varía de 6.8 a 7.3 (Alvariño, 1993). No es aconsejable el uso del pH del semen como un criterio de selección para mejorar la fertilidad del macho por selección indirecta, debido a que la correlación genética entre los rasgos podría no ser lo suficientemente alta (Tussell *et al.*, 2011).

La frecuencia de colección, programas de luz, edad y estado de salud, así como, las estrategias de alimentación, pueden influir cualitativa y cuantitativamente en la producción del esperma (IRRG, 2005).

La cromatina del esperma es relativamente estable entre los 6 y 16 meses de edad. La estabilidad de la cromatina espermática es baja a una edad menor de 5 meses y a una edad mayor a 20 meses (Gogol *et al.*, 2002).

La espermatogénesis se lleva a cabo entre siete y ocho semanas, por lo que la obtención de dos eyaculados colectados una vez por semana (en un periodo de al menos 15 minutos) dará buenos resultados en la producción de semen. En este sentido, se recomienda un periodo mínimo de 10 semanas para determinar el efecto verdadero de factores exógenos (IRRG, 2005). Castellini *et al.* (2006), añaden que el ritmo de colección no sólo influye en la concentración de espermatozoides sino también afecta la producción de gotas prostáticas. Asimismo, mencionan que un ritmo de colección cada 2 semanas es perjudicial tanto para los espermatozoides como para la producción de dichas gotas. Theau-Clément *et al.* (2015) encontraron que la producción de espermatozoides fue más elevada en el primer eyaculado que en el segundo.

La madurez sexual ocurre aproximadamente a los cinco meses de edad (dependiendo de la raza) y la calidad del semen generalmente disminuye con la edad, especialmente cuando son mayores a dos años (IRRG, 2005).

A medida que se incrementa el peso corporal, también se incrementa el tiempo de reacción y los espermatozoides anormales con o sin membrana dañada; mientras que disminuye el volumen seminal, concentración espermática por eyaculado, espermatozoides normales con membrana intacta, número de espermatozoides normales motiles con membrana intacta y dosis útiles de semen para la inseminación artificial (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2015). Cuando se comparan machos jóvenes y adultos entre los 23 y 44 semanas de edad, los animales de edad avanzada tienen más espermatozoides móviles (Theau-Clément *et al.*, 2015).

La estación y ambientes parcialmente acondicionados afectan la fertilidad de los conejos y se manifiesta con una gran variabilidad en la calidad de cada eyaculado, recomendándose evaluar la calidad del semen durante todo el año (Schneidgenová *et al.*, 2011). Asimismo, en condiciones de verano la actividad sexual y las características del eyaculado fueron significativamente menores a los de invierno a unas coordenadas de ubicación de 36.7° N y 3.2° E (Ain-Vaziz *et al.*, 2012), y a 43.5° N y 1.5° E (Theau-Clément *et al.*, 2015). El volumen y la concentración espermática resultan máximos en los meses de marzo a junio y mínimos en el principio de otoño; asimismo, las formas espermáticas anormales aumentan en verano (Alvariño, 1993). Temperaturas superiores a 30 °C, disminuyeron la motilidad (Maya *et al.*, 2015), la viabilidad espermática e incrementaron los defectos celulares (Sabés-Alsina *et al.*, 2015).

2.1.3 El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis. Las células germinales, a diferencia de las de la hembra, comienzan a reducir el número diploide de cromosomas al comenzar la pubertad y una vez iniciados los procesos

de división y diferenciación, se mantienen de forma cíclica durante toda la vida adulta (Álvarez, 2003).

Los espermatozoides se desarrollan en las paredes de los túbulos seminíferos. Durante este proceso, las células diploides primordiales "típicos" se transforman en células haploides únicas, morfológica y funcionalmente específicas. Después de su liberación en el lumen de los túbulos seminíferos pasan al epidídimo, donde los espermatozoides se someten a cambios adicionales de maduración como la adquisición de la capacidad de ser móviles, seguidamente se someten a cambios fisiológicos y bioquímicos en el tracto reproductivo de la hembra para adquirir su capacidad final de fertilización. Las influencias externas como la genética, reacción al oxígeno, temperatura, cambios hormonales, químicos externos y modificaciones del ADN, pueden afectar negativamente la producción de espermatozoides (Chenoweth y Lorton, 2014).

El espermatozoide puede ser dividido en dos componentes: la cabeza y el flagelo o cola. La cabeza en el espermatozoide de conejo es ovoide y discoidal. En ésta se distingue: un núcleo, un acrosoma, una pequeña cantidad de estructuras citoesqueléticas y un reducido citoplasma (Figura 1). El flagelo está constituido por cuatro regiones: cuello, pieza intermedia, y los segmentos principal y terminal. Su longitud es de 46 μm aproximadamente (Álvarez, 2003).

La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración de las espermátidas en espermatozoides. Los cambios más evidentes son la formación del acrosoma, el desarrollo del flagelo, la transformación del núcleo, la reorganización de los organelos del citoplasma, y la liberación de los espermatozoides desde el epitelio tubular al lumen (Álvarez, 2003).

Durante la espermiogénesis, los procesos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos están asociados a cambios en la estructura de la cromatina espermática. En las primeras etapas de la espermatogénesis, el ADN se asocia con nucleoproteínas histonas y con el nucleosoma similares a otras células somáticas. Las nucleoproteínas histonas son sustituidas por proteínas de

transición, las protaminas. Al final, la cromatina tiene una estructura toroidal estrechamente compactada y resistente a la desnaturalización. La compactación es necesaria para proteger la cromatina durante el tránsito por el epidídimo y el tracto reproductivo femenino (D'Occhio *et al.*, 2007).

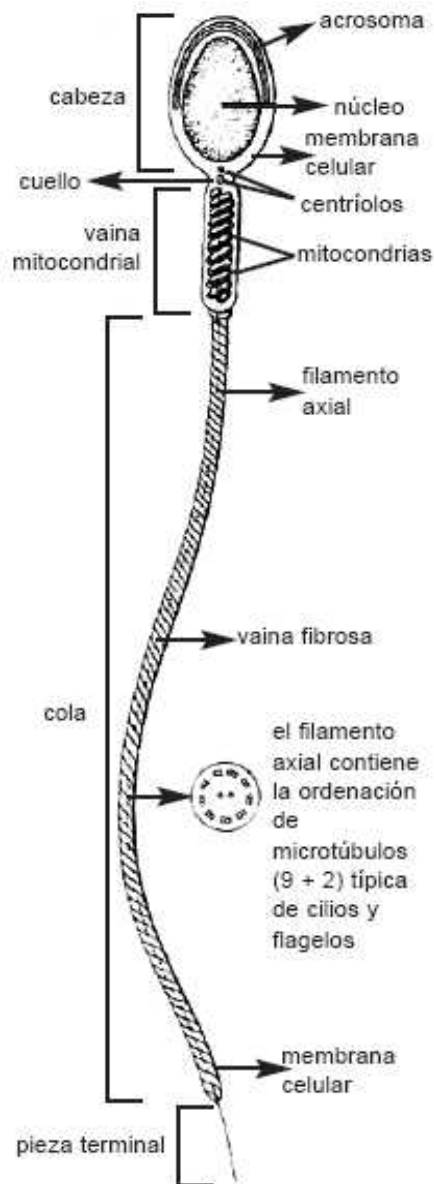


Figura 1. Esquema de un espermatozoide.

La interrupción de la remodelación de la cromatina la hace susceptible a la desnaturalización. La estructura de cromatina inapropiada está relacionada con

la infertilidad masculina, y específicamente con el fracaso del desarrollo embrionario. En este sentido, es posible que la infertilidad del macho sea un componente importante en el desarrollo embrionario (D'Occhio *et al.*, 2007).

Las anomalías morfológicas en función de su origen pueden ser de tipo primario, secundario o terciario. Las anomalías primarias ocurren dentro del epitelio seminífero como resultado de la espermatogénesis anormal antes de la espermiación. Estas anomalías incluyen defectos en la cabeza y acrosoma, así como gotas citoplasmáticas proximales en la pieza intermedia. Las anomalías secundarias se originan después de que las células salen del testículo; éstas se atribuyen a alteraciones de maduración en el epidídimo, retención prolongada en el tracto genital y a la composición anormal del plasma seminal durante la eyaculación. Las anomalías secundarias incluyen gotas citoplasmáticas distales, colas dobladas simples, cabezas normales libres y desprendimiento de acrosomas. Las anomalías terciarias se dan como resultado de la manipulación incorrecta del semen durante o después de la recolección. Los ejemplos incluyen el enfriamiento rápido, altas temperaturas ambientales, contaminación con orina o agua y preparación inadecuada de los portaobjetos para el examen (Chenoweth y Lorton, 2014).

Cuando el espermatozoide es liberado en el lumen de los túbulos, los restos de citoplasma de la espermatida también lo son, de modo que quedan flotando en el lumen o son fagocitados por las células de Sertoli adyacentes. Los cuerpos residuales contienen gran cantidad de lípidos en forma de colesterol. Algunos restos se mantienen unidos a los espermatozoides y se denominan gotas citoplasmáticas. El significado funcional no está claro, pero tiene un extenso retículo endoplasmático y un elevado nivel de la enzima fosfatasa alcalina, estrechamente asociado con varios fenómenos de membrana (Álvarez, 2003).

Los espermatozoides se caracterizan por una rápida migración de la gota citoplasmática cuando pasan de la cabeza proximal a la distal a partir del epidídimo; sin embargo, no se observan cambios proporcionales entre los espermatozoides con cabeza y cola anormal a partir de los testículos, por lo que

se presumen mecanismos de control sobre dichos defectos que incluyen la fagocitosis de espermatozoides (Pérez-Sánchez *et al.*, 1997). El período inmediatamente posterior a la liberación del esperma de los testículos es crucial para la maduración morfológica final de los espermatozoides (Pérez-Sánchez *et al.*, 1998).

En ovinos, el calor irradiado a testículos aislados causó efectos tanto al proceso de espermatogénesis como a la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. Sin embargo, se observó reversibilidad en las características a las 11 semanas post-aislamiento, por lo cual muestra la capacidad del epitelio seminífero para reaccionar a los efectos de los factores ambientales (Cruz *et al.*, 2015).

La capacitación espermática depende de hormonas, iones, señales intracelulares, moléculas espermáticas asociadas, etc. El factor contra la adherencia (ASF por sus siglas en inglés) es una nueva glicoproteína aislada del plasma del epidídimo asociada con la superficie de los espermatozoides. El ASF, es una molécula que mantiene la integridad de la membrana espermática caprina mediante la inhibición de la salida del colesterol. A medida que ocurre el proceso de capacitación *in vitro*, el ASF se libera hacia la superficie del espermatozoide (Roy *et al.*, 2015).

Los espermatozoides también se pueden someter a una evaluación de parámetros morfológicos y morfométricos basada en el tamaño de la cabeza, la cual proporciona una eficiencia del 70% en la identificación de espermatozoides con cromosoma sexual Y, y del 75% para los que tienen cromosoma sexual X. Dicha evaluación se basa en la diferencia de la formación del segmento ecuatorial, creando un pico triangular en la cabeza del espermatozoide con cromosoma X, y un pico secundario pequeño en los espermatozoides con cromosoma Y (Cruz, 2005).

El tamaño de los espermatozoides puede estar involucrado en su transporte, ya sea por medio o a través de la selección y la competencia del esperma en su

camino a encontrarse con el gameto femenino. Los espermatozoides analizados en el reflujo del semen de cerdos fueron más pequeños (cabeza y flagelo) con diferentes formas de cabeza en comparación con el espermatozoides antes de la inseminación (García-Vázquez *et al.*, 2015).

2.1.4 La exposición de hembras y su relación con la calidad seminal

La bioestimulación ejerce efectos positivos en la actividad reproductiva vía sistema hipotalámico a través de la acción de las feromonas. La comunicación feromonal juega un rol importante en el comportamiento y procesos de reproducción de los mamíferos, ya que las feromonas de la orina, heces o de glándulas cutáneas pueden ser percibidas a través del sistema olfatorio para inducir el comportamiento y respuesta endocrina (Patra *et al.*, 2012).

Los métodos de bioestimulación en las hembras son de fácil aplicación, inducen la pubertad, mejoran el estro y la natalidad, son económicos, no afectan la salud animal y mejoran los índices de productividad (Berepubo *et al.*, 1993; Theau-Clément *et al.*, 1998 y Dehnhard, 2011).

Se ha demostrado el efecto del macho en la hembra; en el caso de la orina del ratón, ésta contiene numerosos componentes específicos sexuales e individuales (feromonas), que hacen que la hembra pase más tiempo cerca de la orina del macho. Este acto es memorizado y aprendido inclusive antes de la pubertad, debido a la presencia de una proteína no volátil conocida como darcin. En caso de conejos, la feromona volátil 2-metil-but-2-enal producido por hembras lactantes induce a un rápido aprendizaje para mejorar la eficiencia de la ubicación y aprehensión del pezón durante un sensible período corto postnatal (Roberts *et al.*, 2014; Schaal y Al Aïn, 2014). En el caso de la rata, los machos eyaculan más espermatozoides cuando copulan en presencia de un rival que cuando lo hacen solos (Pound y Gage, 2004).

En caso del panda gigante, se observó que la libido disminuye en machos en cautiverio. Esto puede atribuirse en parte a la falta de suficientes oportunidades para la comunicación química y fomentar el manejo prudente de los olores

sociales para promover el apareamiento natural (Swaisgood *et al.*, 2000). En el caso de aves, se ha observado que los machos que copulan con más frecuencia tienen eyaculados de mayor calidad (Tuttle y Pruett-Jones, 2004); asimismo, se ha notado una relación en el color y disposición del plumaje y la calidad del eyaculado en *Malurus melanocephalus* (Rowe *et al.*, 2010).

Castellini (2008), menciona que en algunos casos la estimulación previa de conejos, aumenta la concentración de espermatozoides; para este fin, basta con poner a una hembra en la parte superior de la jaula del macho durante unos minutos.

La bioestimulación de conejos con la exposición permanente de hembras durante 14 semanas mostró un mejor comportamiento reproductivo expresado en un menor tiempo de reacción, aumento en el volumen de semen, mayor motilidad espermática, más espermatozoides por eyaculado, más espermatozoides móviles vivos normales y mayor dosis de semen. Las características seminales también difieren según la estación, ya que el comportamiento reproductivo en primavera es mejor que en invierno. La exposición de hembras mejora la producción y calidad espermática de los conejos (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2010).

Para mejorar la calidad seminal, Mourvaki *et al.* (2010), alimentaron a conejos machos con diferentes ingredientes alimenticios como semilla de linaza, logrando cambios en la viabilidad espermática (de 74.9 a 77.0%), motilidad (de 72.4 a 75.5%), velocidad curvilínea (de 185.3 a 225.0 μms^{-1}), índice de linealidad (de 48.1 a 45.9%) e índice de desplazamiento lateral de la cabeza (de 2.6 μm). Al utilizar aceite de pescado, no hubo diferencias estadísticas para una viabilidad de 89.73% (Gliozzi *et al.*, 2009).

2.2 Métodos de evaluación seminal

La evaluación del semen es uno de los procedimientos más acertados para predecir la fertilidad de los machos (Kastelic, 2013). El análisis del semen debe

proveer la información necesaria sobre la capacidad de fertilización de los espermatozoides (IRRG, 2005).

Andrade (2005), considera que las pruebas clásicas de la evaluación seminal son la motilidad espermática realizadas por estimación subjetiva o por análisis computarizado, la prueba de resistencia térmica, la concentración, morfología, integridad del acrosoma e integridad de la membrana plasmática (test de endósmosis). A éstas se añaden las pruebas complementarias a partir de la utilización de marcadores fluorescentes (microscopía de fluorescencia y citometría de flujo; con estas pruebas, se puede evaluar la viabilidad, integridad acrosomal y actividad mitocondrial), también se puede valorar la capacitación mediante la prueba de tinción con clortetraciclina, la actividad enzimática del acrosoma, ensayos de unión y penetración a zona pelúcida y pruebas de inducción de la reacción acrosomal.

La evaluación del semen se puede realizar a través de la observación de anomalías compensables e incompensables; la motilidad y morfología del espermatozoide están relacionadas con caracteres compensables. Asimismo, la motilidad, la integridad del acrosoma y de las membranas celulares pueden ser medidas a través de la viabilidad. Las anomalías incompensables se relacionan con defectos cromosomales, estado de las protaminas y quizá anomalías del ARNm (Kastelic, 2013).

En caso de fertilidad reducida, el número de espermatozoides utilizados en la inseminación artificial en la industria porcina puede ser alto (mayor a 3×10^9 de espermatozoides por dosis), debido a la compensación por baja calidad espermática. La evaluación de la motilidad resulta práctica y de bajo costo para la identificación de los verracos menos fértiles a una etapa temprana. Sin embargo, se requiere una evaluación de la técnica para confirmar este supuesto (Foxcroft *et al.*, 2008).

El semen del conejo se colecta por medio de una vagina artificial llenada con un líquido caliente (cercano a 45 °C). El método consiste en una colección sucesiva

de dos eyaculados, cada eyaculado se mantiene a 31 °C en baño María (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2003). Una muestra de semen normal tiene una apariencia homogénea de color blanco opalescente; si presentara gel, éste debe ser removido inmediatamente. Dentro de 5 minutos después de la colección, el semen debe ser diluido (1/2-1/5) con un medio amortiguador a la misma temperatura del semen para evitar cambio brusco de calor o frío. Generalmente, todo manejo adicional tiene un efecto negativo posterior en las características del semen (Castellini *et al.*, 2008).

El comportamiento sexual se puede medir a través de la reacción del animal y la calidad de semen. La evaluación del semen considera una caracterización macroscópica y microscópica. La primera mide el color, aspecto, volumen, peso y el pH del semen; la segunda, considera un estimado de la concentración, motilidad, morfología y la presencia de otros elementos, además de los espermatozoides (IRRG, 2005; Marco-Jiménez *et al.*, 2010; Tussell *et al.*, 2011; Galina y Valencia, 2012).

La motilidad se puede determinar microscópicamente por movimiento de masa y por el movimiento individual lineal progresivo de los espermatozoides. La cantidad de espermatozoides vivos y las anomalías se observan aplicando colorantes (eosina-nigrosina, rojo de Bengala-Azul Victoria, etc.) y realizando un frotis (Galina y Valencia, 2012).

Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011) y Rodríguez-De Lara *et al.* (2015), evaluaron en forma conjunta el comportamiento reproductivo a través del tiempo de reacción y características de los espermatozoides como los móviles normales con membrana intacta para obtener finalmente la dosis de semen para inseminación artificial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comportamiento reproductivo, características seminales, características espermáticas y dosis de eyaculado en trabajos realizados en conejos Nueva Zelanda, México.

Variable	Rodríguez-De Lara <i>et al.</i> (2010)			Fallas-López <i>et al.</i> (2011)		Rodríguez-De Lara <i>et al.</i> (2015)
Descripción general	Exposición de hembras			Eyaculado		Machos adultos
	No	Si	dDE ¹	Primero	Segundo	----
Tiempo de eyaculación (s)	12.7 ^b	13.6 ^a	0.29	9.2±0.7 ^a	7.9±0.7 ^b	13.2±1.7
Variables seminales						
• Volumen (mL)	0.67 ^a	0.48 ^b	0.07	0.86±0.05 ^a	0.55±0.05 ^b	0.6±0.3
• pH	7.58	7.63	0.02	7.49±0.05	7.37±0.07	7.6±0.3
Variables espermáticas						
• Motilidad (%)	78.0 ^a	60.6 ^b	2.9	60.0±2.8 ^b	77.8±2.8 ^a	69.5±21.7
• Espermatozoides/mL (millones)	294	297	13.8	421±43.5 ^b	736±43.5 ^a	296.1±104.8
• Espermatozoides /eyaculado (millones)	188 ^a	143 ^b	18.7	344±26.4	397±26.4	172.9±88.1
• Espermatozoides normales con membrana intacta (%)	77.5	78.1	1.2	58.0±1.8	60.0±1.7	77.9±8.5
Espermatozoides móviles normales membrana intacta (millones/eyaculado)	117 ^a	71 ^b	11.8	118±13.0 ^b	189±13.0 ^a	97.3±66.8
Dosis de semen útiles para inseminación artificial	23a	14b	2.4	24±2.6 b	38±2.6 a	19.3±13.4

Medias sin una letra común dentro de la columnas^{ab} son diferentes ($p \leq 0.05$).

¹ Diferencia de la desviación estándar.

El sistema de análisis de semen asistido por computadora (CASA), ha sido utilizado para evaluar la morfología y movimiento de los espermatozoides. Estos parámetros sirven para determinar la calidad seminal y poder establecer correlaciones con la fertilidad (Verstegen *et al.*, 2002). Este sistema supera las técnicas manuales, pero exige un elevado costo de operación (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007).

El equipo CASA sirve para estudiar la capacitación, reacción del acrosoma y la motilidad espermática; este sistema está conformado por un microscopio de contraste de fases, una videocámara de alta resolución y una computadora que facilita la determinación (IRRG, 2005). El CASA es capaz de determinar la concentración espermática, el número total de espermatozoides, la motilidad y el vigor espermático (Galina y Valencia, 2012). Para ello, requiere lenguajes de programación y algoritmos que procesan imágenes capturadas desde un microscopio, para luego procesarlas y generar una base de datos. Los sistemas CASA identifican varios campos con una cámara, capturan 50 o 60 fotogramas por segundo con 500 a más de 2,000 espermatozoides, y almacenan la información en menos de 2 minutos. Sin embargo, es necesario tener presente que la especie animal, el medio de dilución, la muestra, la intensidad de la iluminación, el hardware y el software de imagen, los ajustes del instrumento, los técnicos, etc., afectan la exactitud y precisión de los valores de salida (Amann y Waberski, 2014).

La evaluación de la membrana plasmática se evalúa a través de su integridad morfológica y funcional. La evaluación morfológica se realiza por contraste de interferencia diferencial, tinciones vitales y microscopía electrónica. Sin embargo, la correlación de estas pruebas con la fertilidad sólo es significativa si las lesiones son muy severas. También se han utilizado técnicas como citometría de flujo, microscopía fluorescente y fluorometría (Galina y Valencia, 2012).

Marco-Jiménez *et al.* (2010), al evaluar parámetros morfométricos de espermatozoides de conejos, encontraron bajo potencial para predecir la

fertilidad y tamaño de camada cuando los eyaculados cumplieron con los requisitos mínimos comúnmente usados en la inseminación artificial.

La evaluación microscópica permite estimar la concentración, motilidad y la presencia de otros elementos en relación a los espermatozoides. Un microscopio de contraste de fases es recomendado para examinar preparaciones sin tinción. Las células vivas/muertas pueden usar diferentes protocolos de coloreo (normal o fluorescencia). El porcentaje de espermatozoides vivos puede ser determinado usando coloraciones que penetran las membranas de las células dañadas. La capacitación y la reacción del acrosoma también pueden ser evaluadas (IRRG, 2005). Las sondas fluorescentes para ADN, enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas o potencial de membrana, son técnicas utilizadas para evaluar la funcionabilidad espermática (Galina y Valencia, 2012).

El efecto de la criopreservación también puede ser estudiado con sistemas similares al CASA (CASA paradox), pero es necesario realizar algunos ajustes para estimar adecuadamente el nivel de daño producido (Katkov y Lulat, 2001).

Las técnicas para estudiar la morfometría de espermatozoides incluyen microscopía óptica, microscopía de contraste de fases y, más recientemente, la microscopía de fluorescencia. La mayoría de los estudios publicados sobre la morfometría del espermatozoide se han centrado en la cabeza del espermatozoide, aunque también se midieron otras estructuras como el núcleo, acrosoma, pieza intermedia o flagelo. Datos morfométricos proporcionados por el sistema de análisis morfológico asistido por computadora (CASMA por sus siglas en inglés) pueden ser analizados mediante la estadística clásica, aunque dada la heterogeneidad de los espermatozoides en el eyaculado, el estudio de subpoblaciones espermáticas utilizando procedimientos de agrupamiento puede ser más relevante. Los resultados morfométricos pueden variar dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos con relación al semen del donante. Los factores intrínsecos pueden incluir, entre otros, los factores genéticos, la edad y la madurez sexual. Los factores extrínsecos pueden incluir las relacionadas con la influencia del medio

ambiente sobre el donante, así como las relacionadas con el procesamiento de la muestra y el propio análisis morfométrico (Yaniz *et al.*, 2015).

Es fácil determinar el potencial fecundante del semen que no presenta espermatozoides viables, lo difícil es juzgar el semen que presenta un índice relativamente elevado de motilidad progresiva (<30%) y prever su fertilidad en un proceso adecuado de inseminación artificial (Galina y Valencia, 2012).

La tasa de gestación en caballos después de usar dosis de 15 a 65% de esperma morfológicamente normal es variable, incluso si ambos contienen el mismo número de espermatozoides móviles morfológicamente normales y progresivos. La dosis de cría con diferentes defectos en los espermatozoides puede tener distintos efectos sobre la fertilidad, incluso cuando los porcentajes de espermatozoides normales son iguales (Brito, 2007).

La prueba hiposmótica consiste en poner en contacto una muestra de semen con una solución ligeramente hipotónica. El porcentaje de espermatozoides que después de cierto tiempo hayan sufrido una curvatura de la cola, representan aquellos que eran normales y cuya membrana citoplasmática fue capaz de reaccionar ante el estrés osmótico (Galina y Valencia, 2012).

El-Battawy y El-Nattat (2013), demostraron que la viabilidad es factible medirla en semen de conejos a través de la prueba de reducción de la resazurina a resorufina.

Soler *et al.* (2015), describen un método de fácil preparación aplicable para el análisis de espermatozoides vivos normales. La evaluación de la morfología según el sistema Trumorph®, está basado en el examen de preparaciones húmedas de espermatozoides vivos inmovilizados a 60 °C usando microscopía de contraste de fases negativas. Así la cabeza y la cola del espermatozoide fueron perfectamente definidos, incluyendo el acrosoma y la pieza intermedia (en toda su longitud, incluyendo gotas citoplasmáticas). Además de los encontrados

por preparaciones y teñidos convencionales, se observó una gama de formas morfológicas, distinguibles sólo por la óptica utilizada.

Soler *et al.* (2015), también encontraron que con el método Trumorph®, la cabeza del espermatozoide del conejo fue diferente a otras especies y el acrosoma más oscuro que la región post-acrosomal. Esta situación se invirtió para algunas células, indicando diferente densidad en la estructura del acrosoma. La pieza intermedia fue más corta que para otras especies. Algunos fueron ligeramente curvados. Las gotas citoplasmáticas fueron muy bien definidas, produciendo una curvatura severa de la pieza. Algunas piezas principales fueron dobladas (Figura 2).

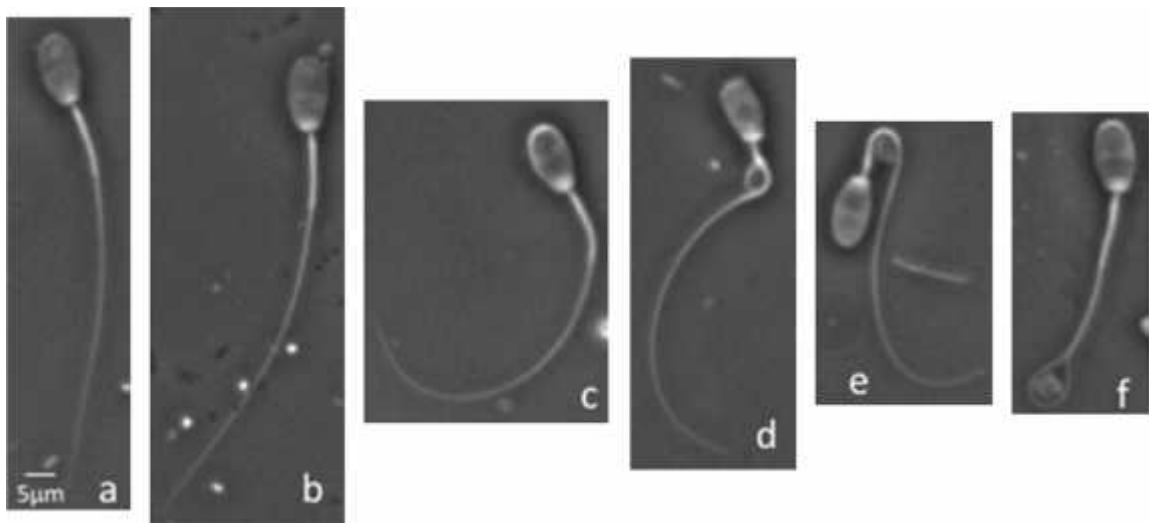


Figura 2. Anormalidades en espermatozoides de conejo.

(a, b) morfología "normal"; (c) pieza intermedia doblada; (d, e) gota citoplasmática; (f) pieza principal en espiral.

Wessel y Althouse (2006), en un trabajo con semen de caballos, demostraron que con la opción "Viadent" del sistema óptico visual integrado (IVOS por sus siglas en inglés), la evaluación de los parámetros de viabilidad y motilidad puede ser más rápida, precisa y objetiva utilizando un gran número de espermatozoides.

Existe evidencia que proteínas en el plasma seminal del verraco tienen un papel específico en el proceso de fertilización y contribuye en la calidad del semen y fertilidad del verraco. La evaluación de estos marcadores potenciales de fertilidad puede proporcionar la base para el uso de las proteínas en el plasma seminal e identificar los sitios con alta y baja fertilidad (Foxcroft *et al.*, 2008).

La concentración de colesterol en el plasma seminal de bovinos están asociados con el uso de lípidos extracelulares y parecen ser aplicables como marcadores bioquímicos de la calidad del esperma (Beer-Ljubic *et al.*, 2009).

2.2.1 Evaluación del semen utilizando el sistema CASA

El análisis de semen requiere programas de control de calidad externos y recomendaciones de procedimientos estandarizados como los que sugiere la Organización Mundial de la Salud (Filimberti *et al.*, 2013; Rivera-Montes *et al.*, 2013). Sin embargo, aún no se ha implementado una reglamentación internacional para los ajustes del equipo CASA (Restrepo *et al.*, 2013), de allí que cada sistema comercializado varía en metodología (Amann y Waberski, 2014).

Los sistemas CASA son capaces de medir la motilidad, concentración, morfología y cinética espermática. El sistema CASA, tiene dos ventajas sobre los métodos manuales: alta precisión y proporción de datos cuantitativos sobre los parámetros cinéticos de espermatozoides ya que evalúan el avance hacia adelante y la motilidad hiperactiva característica de las células capacitadas. El análisis cinético detecta células móviles en porcentaje aunque puede ser poco confiable, ya que los espermatozoides inmóviles se pueden confundir con residuos. El sistema CASA analiza las trayectorias de al menos 200 espermatozoides móviles o 400, incluidos los no móviles, para evitar errores por colisión. Los programas informáticos organizan los datos y realizan el análisis estadístico considerando que muchas de las distribuciones de los parámetros de movimiento no son de tipo gaussianas. Asimismo, es necesario tener presente que la mediana es más apropiada que la media, y que las mediciones pueden necesitar ser

transformadas matemáticamente antes se realizar los análisis estadísticos (WHO, 2010).

En concordancia con el 5° Manual para el examen y procesamiento del semen humano publicado por la OMS, se considera que el 81% de los investigadores latino americanos creen que el nuevo manual estandariza mejor la concentración espermática y un 96% está de acuerdo con la nueva clasificación en la motilidad espermática en progresiva (A), no progresiva (B) e inmóvil (C). Respecto a los controles de calidad, se informa que sólo el 18% realiza controles de calidad externa. El 100% de los investigadores estima conveniente realizar continuos talleres de estandarización. Sin embargo, se debe mejorar la versión estandarizada con respecto a la determinación de la concentración espermática (15 millones por mL) y la morfología (4%), ya que los valores de referencia se consideran muy bajos (Espinoza-Navarro y Sarabia, 2011).

La validez de los sistemas CASA garantizan la información necesaria para realizar el control y garantizar la calidad, su comercialización e investigación del semen. Para ello se deben recordar: 1) muchos factores pueden influir en la exactitud y precisión de los valores de salida; por lo que es necesario validar y revalidar de forma regular todas las configuraciones de hardware y software con las muestras y técnico(s); y 2) determinar los límites de los subgrupos apropiados para cada medida del movimiento del espermatozoide en las muestras típicas a evaluar y usar estos límites para visualizar y resumir las subpoblaciones de espermatozoides en cada muestra analizada no basadas en medias o medianas (Amann y Waberski, 2014).

Además de determinar la motilidad total y progresiva de los espermatozoides, los sistemas CASA utilizan algoritmos para calcular la concentración de espermatozoides y diversos parámetros de velocidad. Los parámetros con las características mínimas de configuración deseada deben definirse previamente. Diferentes cámaras de muestras conocidas como lejas están disponibles para su uso en los sistemas CASA. Se prefieren las cámaras de 10-20 μm de profundidad para reducir al mínimo cualquier incapacidad para detectar y controlar la

concentración de espermatozoides y su movimiento dentro y fuera del plano focal. Varios fabricantes ofrecen cámaras desechables de profundidad fija. La cámara de Leja® (Leja Products BV, Países Bajos) es utilizado por muchos sistemas CASA según se observa en la Figura 3 (Chenoweth y Lorton *et al.*, 2014).

Safaa *et al.* (2008) y Lukac *et al.* (2009), caracterizaron reproductivamente al conejo mediante el CASA. Safaa *et al.* (2008), lograron establecer diferencias entre las características seminales de dos líneas raciales. Sin embargo, mencionaron que se necesita interrelacionar mejor las características del espermatozoide con los factores nutricionales, estacionales y técnicas de conservación.

La IRRG (2005), menciona que la motilidad espermática en conejos puede ser evaluada por el CASA. Este sistema incluye un microscopio de contraste de fases, equipado con una fuente de calor conectado a una videocámara de alta resolución y una computadora. Los procedimientos más importantes incluyen la determinación del número de campos analizados, el número de gotas por muestra analizada, la temperatura de la muestra durante el análisis y la concentración de la muestra. Las muestras de semen también se evalúan a través del sistema de análisis con asistencia del equipo HT CASA II (Hamilton Thorne, 2013). El CASA permite evaluar las características cinéticas de los espermatozoides (Cuadro 2).

Varios experimentos fueron realizados con sistemas de análisis de semen con asistencia de computadoras para evaluar el semen de conejos de la raza Nueva Zelanda y líneas derivadas de ellas (Cuadro 3). Actualmente, los estudios se realizan más en líneas comerciales (Cuadro 4).

Cuadro 2. Variables de cinética de los espermatozoides a evaluar.

Sigla	Descripción de la variable cinética	Unidad
DAP	Longitud de trayectoria promedio	μm
DSL	Longitud de la trayectoria rectilínea	μm
DCL	Longitud de la trayectoria curvilínea	μm
VAP	Velocidad media	μm/s
VSL	Velocidad rectilínea	μm/s
VCL	Velocidad curvilínea	μm/s
STR	Índice de rectitud	%
LIN	Índice de linealidad	%
ALH	Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza	μm
BCF	Frecuencia de batida	Hz
WOB	Índice de estabilidad	%

En cerdos, Broekhuijse *et al.* (2012), evaluaron la interrelación entre los parámetros que determina el sistema CASA con el tamaño de camada al nacimiento. En el trabajo, se relacionan los parámetros de motilidad con la capacidad de fertilización de los eyaculados de verracos medido a través del índice de partos y de la natalidad. Con base en la motilidad evaluada, el sistema CASA discrimina la capacidad de fertilización de los eyaculados, aunque ello depende de la línea genética del verraco usado según las estaciones. En porcinos también se evaluó el efecto hormonal en el comportamiento y las características cinéticas de los espermatozoides (Fraser *et al.*, 2001).

El efecto de aumento de la temperatura ambiental y de la radiación sobre la calidad del semen refrigerado de verracos para inseminación artificial fue evaluado mediante parámetros convencionales de concentración, motilidad, morfología y viabilidad, parámetros que evalúan los lípidos de membrana relacionados con la capacitación espermática, contenido de calcio intracelular y la actividad de la acrosina. Solamente ésta última exhibió un patrón claramente diferenciada en asociación con el aumento de la temperatura y la radiación, y una correlación significativa con la tasa de gestación y el tamaño de la camada (Pinart *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Características seminales y espermáticas de trabajos realizados en Europa con conejos de la raza Nueva Zelanda utilizando sistemas asistidos por computadora.

Variable	Lavara <i>et al.</i> (2005)	Lavara <i>et al.</i> (2010)	Chrenek <i>et al.</i> (2011)	Schneidgenová <i>et al.</i> (2011)	
Coordenadas geográficas	39.5° N - 0.3° O	39.5° N - 0.3° O	8.3° N - 08.3° E	8.3° N - 08.3° E	
Estación	----	Verano-Otoño	----	Verano	Otoño
Volumen (mL)	----	0.6±0.3	0.6±0.2	0.6±0.1	0.6±0.3
Motilidad total (%)	80.5 (10.9)	70.0±26.8	70.2±22.3	79.4±12.5	72.7±18.7
Motilidad progresiva (%)	----	----	59.8±26.4	66.4±20.0	56.8±29.2
VCL (µm/s)	54.8 ±24.7	72.7±19.3	96.8±28.8	98.0±21.8	93.3±30.3
VSL (µm/s)	26.1 ±10.1	42.9±14.7	36.3±14.1	37.6±10.6	36.5±15.0
VAP (µm/s)	36.0 ±14.9	49.6±15.1	46.2±16.5	50.7±12.8	47.6±17.4
LIN (%)	53.4±14.6	59.3±16.0	35±12	38±4	39±10
STR (%)	----	80.3±10.5	73±19	73±5	76±7
WOB (%)	66.9 ±8.8	67.9±15.2	47±38	51±3	51±10
ALH (µm)	2.05 ±1.0	3.0±1.2	3.4±1.4	4.4±0.7	4.0±0.8
BCF (Hz)	11.3 ±1.8	----	29.5±9.6	25.9±3.6	26.2±7.7
Espermatozoides /eyaculado (millones)	----	----	940±950	1110±430	1100±540
Espermatozoides (millones/mL)	----	1554±1099	----	----	----

Cuadro 4. Características seminales y espermáticas de trabajos realizados en Europa con conejos híbridos-Nueva Zelanda utilizando sistemas asistidos por computadora.

Variable	Theau-Clément <i>et al.</i> (2015)	Sabés-Alsina <i>et al.</i> (2015)	Maya <i>et al.</i> (2015)	Castellini <i>et al.</i> (2013)
Coordenadas geográficas	43.5° N - 31.5° E	41.6° N - 2.2 E	41.6° N - 2.2 E	43.1° N - 12.4° E
Volumen (mL)	0.43 a 0.56	0.84±0.1 a 0.9±0.1	----	0.55±0.1
pH	6.84 a 7.01	----	----	----
Viabilidad (%)	----	74.2±2.3 a 80.7±1.6	77.1±3.5 a 78.3±3.3	----
Anormalidades morfológicas (%)	----	----	37.1±2.4 a 42.4±14.9	----
Presencia de gota citoplasmática proximal (%)	----	5.7±1.4 a 5.9±1.9	----	----
Presencia de gota citoplasmática distal (%)	----	1.3±0.3 a 1.5±0.2	----	----
Espermatozoides con cola doblada (%)	----	4.6±0.6 a 5.0±0.9	----	----
Espermatozoides con cola enrollada (%)	----	2.6±0.5 a 2.6±0.6	----	----
Motilidad total (%)	54.9 a 72.5	59.9±4.7 a 64.6±3.3	55.6±14.6 a 78.5±1.4	38.1±10.1 a 83.5±8.5
Motilidad progresiva (%)	31.1 a 44.0	26.1±1.7 a 28.5±2.4	20.1±7.2 a 38.2±2.7	----
VCL (µm/s)	----	99.5±3.9 a 101.5±2.7	56.7±1.5 a 137.7±1.5	150.6±38.4 a 210.8±31.5
VSL (µm/s)	----	40.7±1.9 a 42.5±2.8	11.6±0.7 a 68.7±1.0	----
VAP (µm/s)	75 a 108	65.7±4.0 a 66.7±2.6	25.8±0.8 a 81.1±1.2	----
LIN (%)	31.3 a 43.2	41.6±1.7 a 44.0±2.5	14.3±0.7 a 61.7±1.0	30.5±12.9 a 39.8±12.9
STR (%)	----	61.1±1.5 a 64.4±2.1	38.9±0.9 a 84.9±1.3	----
WOB (%)	----	65.1±1.7 a 65.6±2.5	37.6±0.7 a 72.5±1.1	----
ALH (µm)	4.67 a 6.64	3.6±0.1 a 3.7±0.1	2.81±0.1 a 6.2±0.1	2.0±0.25 a 3.0± 0.25
BCF (Hz)	----	9.4±0.2 a 9.4±0.4	5.6±0.2 a 10.7±0.2	----
Espermatozoides/mL (millones)	467 a 685	209±33 a 246±23	----	415±32
Espermatozoides /eyaculado (millones)	185 a 355	153±27 a 189± 9	----	----
Espermatozoides motiles /eyaculado (millones)	150 a 326	----	----	----

En el caso de cabras, se evaluaron los parámetros de movimiento de los espermatozoides medidos por sistema CASA en la determinación del comportamiento de los espermatozoides para colonizar la unión útero-tubárica y relacionarla con la fecundación de los ovocitos (Cox *et al.*, 2006).

En caballos, se evaluó la motilidad, membrana e integridad del acrosoma y el estado de la capacitación de espermatozoides descongelados de sementales con el sistema CASA, y una tinción con fluoróforo y merocianina 540, utilizando citometría de flujo (Kavak *et al.*, 2003). También se evaluó el efecto de la dilución del semen a una concentración menor a 20×10^6 espermatozoides/mL. La calidad del espermatozoide se estudió a través de las características de movimiento del espermatozoide (motilidad total y progresiva, velocidad curvilínea e índice de rectitud) y la integridad de la membrana plasmática (Hayden *et al.*, 2015).

Dorado *et al.* (2013), evaluaron la calidad del espermatozoide en diferentes subpoblaciones espermáticas de burros con diferente nivel de fertilidad. Las subpoblaciones espermáticas fueron: espermatozoides lentos y no progresivos (20%), moderadamente lentos progresivos (71.2%), muy activos no progresivos (2.9%), y altamente activos y progresivos (5.9%).

La crioconservación de semen de toro utilizando una máquina de congelación automática fue realizado para estudiar el semen de toros Gyr, donde se logró mantener el equilibrio de la motilidad espermática y la integridad de la membrana (Guimarães *et al.*, 2010).

En ovinos se evaluó la cabeza del espermatozoide como característica morfológica para predecir la capacidad de fertilización. El equipo usado fue el analizador Sperm-Class. El estudio sugiere que un componente genético podría ser responsable de las diferencias morfométricas en las cabezas de los espermatozoides entre los rebaños (Maroto-Morales *et al.*, 2006).

Cuando se estudió el perfil de proteínas de la membrana de los espermatozoides de carneros tropicales adaptados Morada Nova, se encontró que los procesos

biológicos más comunes asociados con las proteínas de la membrana fueron: procesos celulares (34%), respuesta a los estímulos (14%), y a los procesos metabólicos (11%). Las funciones moleculares más frecuentes fueron de enlace (37%) y la actividad catalítica (32%). En el plasma seminal y en las membranas espermáticas se encontraron las proteínas RSVP14 y Bdh-2 (Van Tilburg *et al.*, 2013).

La relación entre el plasma seminal con las concentraciones séricas de zinc, selenio y testosterona en gatos domésticos, demuestran que existen correlaciones negativas entre el selenio y las concentraciones en el plasma seminal y defectos de carga total de espermatozoides, así como con las concentraciones de selenio en el suero y VAP, VSL, STR y LIN. Las concentraciones séricas de Zn se correlacionaron negativamente con el total de defectos de espermatozoides anormales y pieza intermedia y positivamente relacionados con la motilidad progresiva. Las concentraciones de Se mostraron una correlación negativa con el peso total de los testículos, mientras que la concentración de testosterona en el plasma seminal y el suero se correlacionaron con el volumen testicular y peso total haciendo que éstos sean posibles candidatos para marcadores de fertilidad (Villaverde *et al.*, 2014).

En humanos, los parámetros seminales de la población fértil estudiada están por encima del límite inferior de referencia (90%), propuesto por la OMS. Los valores de la mediana fueron: pH 8; volumen, 2.5 mL; concentración, 82.5 millones/mL; movilidad total de espermatozoides progresivos y no progresivos, 68.5%; movilidad progresiva, 58.0%; viabilidad, 76.0%; y, morfología normal, 10.5% (Henao, 2013).

2.3 Literatura citada

- Ain-Vaziz, H., I. Boulbina, I. Ilès, R. Belabbas, S. Zenia, and S. Temim. 2012. Influence of environmental temperature and relative humidity on semen characteristics in male rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) of local algerian population. *In*: 10th World Rabbit Congress. September 3 - 6, 2012. Sharm El-Sheikh-Egypt. World Rabbit Science Association. 347-350.
- Álvarez, C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. España. 174 p.
- Alvariño, M. R. 1993. Control de la Reproducción en el Conejo. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. 137 p.
- Amann, R. P., and D. Waberski. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5-17.
- Andrade M., A. C. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 309p.
- Ambriz, D., J. García, L. Contreras, O. Hernández, E. Mercado, F. Cervantes, y A. Rosado. 2003. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zoológica Mexicana* 88: 257-269.
- Beer-Ljubic´, B., J. Aladrovic´, T.S. Marenjak, R. Las´kaj, I. Majic´-Balic´, and S. Milinkovic´-Tur. 2009. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology* 72: 1132-1140.
- Berepubo, A., M. Nodu, A. Monsi, and E. Amadi. 1993. Reproductive response of prepubertal female rabbit to photoperiod and/or male presence. *World Rabbit Science* 1(2): 83-87.
- Brito, L. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6: 249-264.
- Broekhuijse, M., E. Sostaric, H. Feitsma, and B. Gadella. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science* 90: 779-789.
- Castellini C., P. Lattaioli, R. Cardinali, and A. Dal Bosco. 2006. Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet concentration of rabbit semen. *World Rabbit Science* 14: 101-106.
- Castellini, C. 2008. Semen production and management of rabbit bucks. *In*: 9th World Rabbit Congress. June 10-13. Verona, Italy. pp. 265-278.

- Castellini, C., S. Mattioli, S. Ruggeri, A. Dal Bosco, and G. Collodel. 2013. The time-dependent effects of prostate granules and seminal plasma on the capacitation, acrosome reaction, and motility of rabbit sperm. *Animal Reproduction Science* 140: 97-102.
- Chenoweth, P., and S. Lorton. 2014. *Andrology*. CABI. 595 p.
- Chrenek, P., J. Vasicek, M. Schneidgenova, M. Vondrakova, and J. Trandik. 2011. Spermatozoa quality of the transgenic rabbit offspring. *Slovak Journal of Animal Science* 44 (3): 124-128.
- Collodel, G., R. Cardinali, E. Moretti, S. Mattioli, S. Ruggeri, and C. Castellini. 2012. Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. *Theriogenology* 77: 1021-1026.
- Cox, J. F., V. Alfaro, V. Montenegro, and H. Rodriguez-Martinez. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* 66: 860-867.
- Cruz, M. 2005. Evaluación de la eficiencia de un equipo de citometría de flujo y de dos fluorocromos para el sexado de semen congelado. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 74 p.
- Cruz, C. A., C. M. Lucci, V. Peripolli, A. F. Silva, A. M. Menezes, S. R. L. Morais, M. S. Araújo, L. M. C. S. Ribeiro, R. C. Mattos, and C. McManus. 2015. Effects of testicle insulation on seminal traits in rams: preliminary study. *Small Ruminant Research* 130: 157-165.
- Dehnhard, M. 2011. Relationship between fecal hormone concentrations and reproductive success in captive pygmy rabbits (*Brachylagus idahoensis*). *International Zoo Yearbook* 45: 55-79.
- D'Occhio, M. J., K. J. Hengstberger, and S. D. Johnston. 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science* 101: 1-17.
- Dorado, J., D. Acha, I. Ortiz, M. J. Gálvez, J. J. Carrasco, B. Díaz, V. Gómez-Arrones, R. Calero-Carretero, and M. Hidalgo. 2013. Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science* 143: 64-71.
- Easson, W. 2001. A review of rabbit and rodent production medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10(3): 131-139.
- El-Battawy, E. I., and W. S. El-Nattat. 2013. Evaluation of rabbit semen quality using resazurin reduction test. *Global Veterinaria* 11(6): 767-770.
- Espinoza-Navarro, O., y L. Sarabia. 2011. Evaluación y estandarización de la calidad del espermiograma: nuevos límites inferiores de referencia. *International Journal Morphology* 29(3): 885-890.
- Fallas-López, M., R. Rodríguez-De Lara, R. Bárcena-Gama, M. T. Sánchez-Torres Esqueda, D. Hernández-Sánchez, P. A. Martínez-Hernández, and

- O. Aguilar-Romero. 2011. Rabbit sexual behavior, semen and sperm characteristics when supplemented with sprouted wheat. *Animal Reproduction Science* 129: 221-228.
- Foxcroft G. R., M. K. Dyck, A. Ruiz-Sanchez, S. Novak, and W. T. Dixon. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology* 70: 1324-1336.
- Filimberti, E. S. Degl'Innocenti, M. Borsotti, M. Quercioli, P. Piomboni, I. Natali, M. G. Fino, C. Caglieresi, L. Criscuoli, L. Gandini, A. Biggeri, M. Maggi, and E. Baldi. 2013. High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. *Andrology* 1: 401-407.
- Fraser, L., J. Strzezek, y F. Saiz. 2001. Variaciones en el movimiento de los espermatozoides de verraco durante la administración de acetato de ciproterona (ACP). *Investigación Agraria: Producción Sanidad Animal* 16(1): 135-142.
- Fuentes, V., C. Villagran, and J. Navarro. 2004. Sexual behavior of male New Zealand white rabbits in an intensive production unit. *Animal Reproduction Science* 80: 157-162.
- Galina, C., y J. Valencia. 2012. *Reproducción de Animales Domésticos*. 3a. ed. Limusa. México. 582 p.
- García-Vázquez, F., A. García-Vázquez, I. Hernández-Caravaca, W. Yáñez-Quintana, C. Matás, C. Soriano-Úbeda, and M. J. Izquierdo-Rico. 2015. Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology* 84(4): 566-574.
- Gliozzi, T. M., L. Zaniboni, A. Maldjian, F. Luzi, L. Maertens, and S. Cerolini. 2009. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology* 71: 910-919.
- Gogol, P., M. Bochenek, and Z. Smora. 2002. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 92-95.
- Guimarães, T., V. Ribeiro do Vale, R. Paes, A. Furugen, L. Luz, F. Gilli, J. André, and V. José de Andrade. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 120: 31-38.
- Hamilton Thorne. 2013. HT CASA II Software Manual. Version 1.3. Hamilton Thorne, Inc. Beverly, MA, USA. 99 p.
- Hayden, S. S., T. L. Blanchard, S. P. Brinsko, D. D. Varner, K. Hinrichs, and Ch. C. Love. 2015. The "dilution effect" in stallion sperm. *Theriogenology* 83: 772-777.
- Henao, M. S. 2013. Evaluación de los parámetros seminales en 30 hombres con fertilidad probada y breve revisión de la literatura. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 39(4): 368-382.

- Herrera, J., A. Avalos, I. Rodríguez, J. González, y A. Rosales. 2013. Técnicas de reproducción asistida en aves domésticas y silvestres. CBS Manual N° 41. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México. 71 p.
- Holt, W. V., and Fazeli, A. 2016. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms and new opportunities. *Theriogenology* 85: 105-112.
- IRRG (International Rabbit Reproduction Group). 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science* 13: 71-91.
- Jensen, P. 2004. *Etología de los Animales Domésticos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 239 p.
- Jiménez P., M. A. Serrano-Meneses, E. Cuamatzi, and G. González-Mariscal. 2012. Analysis of sexual behaviour in male rabbits across successive tests leading to sexual exhaustion. *World Rabbit Science* 20: 13-23.
- Kastelic, J. 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers* 3(4): 20-25.
- Katkov, I., and A. Lulat. 2000. Do conventional CASA-parameters reflect recovery of kinematics after freezing?: "CASA PARADOX" in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *CryoLetters* 21: 141-148.
- Kavak A., A. Johannisson, N. Lundeheim, H. Rodriguez-Martinez, M. Aidnik, and S. Einarsson. 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 76: 205-216.
- Lavara, R., E. Mocé, F. Lavara, M. P. Viudes de Castro, and J. S. Vicente. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* 64: 1130-1141.
- Lavara, R., M. Baselga, and J. S. Vicente. 2010. Aneuploidy in rabbit males: semen traits and fertility. *Theriogenology* 74: 105-110.
- Lukac N., P. Massanyi, S. Flesarova, J. Danko, A. V. Makarevich, and P. Chrenek. 2009. Comparison of semen characteristics and histological structure of the testis from transgenic and non-transgenic rabbits. *World Rabbit Science* 17: 221-226.
- Marco-Jiménez, F., J-S. Vicente, R. Lavara, S. Balasch, and M-P. Viudes-de-Castro. 2010. Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 118-123.
- Maya-Soriano, M. J., E. Taberner, M. Sabés-Alsina, J. Ramon, O. Rafel, L. Tusell, M. Piles, and M. López-Béjar. 2015. Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an *in vivo* rabbit model. *Theriogenology* 84: 384-389.
- Maroto-Morales A., M. Ramón, O. García-Álvarez, A. J. Soler, M. C. Estesó, Martínez-Pastor, F., M. D. Pérez-Guzmán, and J. J. Garde. 2010.

- Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73: 437-448.
- Mendoza, B. 2007. La cunicultura en México: presente y futuro. *Extensión al campo* 1(5): 18-20.
- McNitt, J., S. Lukefahr, P. Cheeke, and Patton, N. 2013. *Rabbit Production*. 9th. ed. CABI. 300p.
- Mourvaki E., R. Cardinali, A. Dal Bosco, L. Corazzi, and C. Castellini. 2010. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. *Theriogenology* 73: 629-637.
- Nizza A., C. Di Meo, S. Taranto, and G. Stanco. 2002. Effect of collection frequency on rabbit semen production. *World Rabbit Science* 10(2): 49-52.
- Orihuela, A. 2014. La conducta sexual del carnero. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 5(1): 49-89.
- Padilla, F., y A. Cuesta. 2003. *Zoología Aplicada*. Días de Santos. Madrid, España. 462 p.
- Patra M., P. Barman, and H. Kumar. 2012. Potential application of pheromones in reproduction of farm animals - a review. *Agricultural Reviews* 33(1): 82-86.
- Pérez-Sánchez, F., L. Tablado, and C. Soler. 1997. Sperm morphological abnormalities appearing in the mail rabbit reproductive tract. *Theriogenology* 47: 893-901.
- Pérez-Sánchez, F., L. Tablado, and C. Soler. 1998. Quantitative changes in sperm head morphology during passage through the male excurrent duct system of the rabbit. *Molecular Reproduction and Development* 51: 203-209.
- Perkins, A. and Fitzgerald J. A. 1992. Luteinizing hormone, testosterone, and behavioral response of male-oriented rams to estrous ewes and rams. *Journal Animal Science* 70: 1787-1794.
- Piehl, L. L., M. Laura, U. Hellman, H. Cisale, and P. V. Miranda. 2013. Boar seminal plasma exosomes: Effect on sperm function and protein identification by sequencing. *Theriogenology* 79: 1071-1082.
- Pinart, E., M. Yeste, M. Puigmulé, X. Barrera, and S. Bonet. 2013. Acrosin activity is a suitable indicator of boar semen preservation at 17°C when increasing environmental temperature and radiation. *Theriogenology* 80: 234-247.
- Pound, N., and M. Gage. 2004. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Animal Behaviour* 68: 819-823.
- Price, E., y A. Orihuela. 2010. *Conducta Animal Aplicada al Cuidado y Producción Pecuaria*. Trillas. México. 111 p.

- Quera, V., y J. L. Losada. 2014. Etología. 1a. ed. UOC. Barcelona. 520 p.
- Restrepo, G., A. Úsuga, y B. Rojano. 2013. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8(1): 69-81.
- Rivera-Montes, A. M., A. Rivera-Gallegos, E. Rodríguez-Villasana, A. Juárez-Bengoa, M. A. Díaz-Pérez, y M. Hernández-Valencia. 2013. Estimación de la variabilidad en la evaluación del análisis seminal. *Ginecología y Obstetricia de México* 81: 639-644.
- Roberts, S., A. Davidson, R. Beynon, and J. Hurst. 2014. Female attraction to male scent and associative learning: the house mouse as a mammalian model. *Animal Behaviour* 97: 313-321.
- Rodríguez-De Lara, M. López-Fallas, R. Rangel-Santos, and V. Mariscal-Aguayo. 2003. Influence of short-term relocation and male exposure on sexual receptivity and reproduction in artificially inseminated lactating doe rabbits. *Animal Reproduction Science* 78: 111-121.
- Rodríguez-De Lara, J. Noguez-Estrada, R. Rangel-Santos, J. G. García-Muñiz, P. A. Martínez-Hernández, M. Fallas-López, and E. Maldonado-Siman. 2010. Controlled doe exposure as biostimulation of buck rabbits. *Animal Reproduction Science* 122: 270-275.
- Rodríguez-De Lara, R., M. Fallas-López, J. G. García-Muñiz, P. A. Martínez-Hernández, R. Rangel-Santos, E. Maldonado-Siman, and J. A. Cadena-Meneses. 2015. Sexual behavior and seminal characteristics of fertile mature New Zealand White male rabbits of different body weights. *Animal Reproduction Science* 152: 90-98.
- Roselli, C. E., F. Stormshak, J. N. Stellflug, and J. A. Resko. 2002. Relationship of serum testosterone concentrations to mate preferences in rams. *Biology of Reproduction* 67: 263-268.
- Roy, D., S. Dey, G. C. Majumder, and D. Bhattacharyya. 2015. Role of epididymal anti sticking factor in sperm capacitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 463: 948-953.
- Rowe, M., J. P. Swaddle, S. Pruett-Jones, and M. S. Webster. 2010. Plumage coloration, ejaculate quality and reproductive phenotype in the red-backed fairy-wren. *Animal Behaviour* 79: 1239-1246.
- Sabés-Alsina, M., N. Planell, E. Torres-Mejia, E. Taberner, M. J. Maya-Soriano, L. Tusell, J. Ramon, A. Dalmau, M. Piles, and M. Lopez-Bejar. 2015. Daily exposure to summer circadian cycles affects spermatogenesis, but not fertility in an in vivo rabbit model. *Theriogenology* 83: 246-252.
- Saffa H. M., J. S. Vicente, R. Lavara, and M. Viudes de Castro. 2008. Semen evaluation of two selected lines of rabbit bucks. *World Rabbit Science* 16: 141-148.

- Sañudo, C. 2011. Atlas Mundial de Etnología Zootécnica. SERVET. Navarra, España. 818p.
- SAS (Statistical Analysis System Institute). 2011. Base SAS® 9.3 Procedures Guide: Statistical Procedures. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 536 p.
- Schaal, B., and S. Al Aïn. 2014. Chemical signals 'selected for' newborns in mammals. *Animal Behaviour* 97: 289-299.
- Schneidgenová, M., J. Vašíček, P. Čupka, and P. Chrenek. 2011. Is it necessary to control seasonal quality of the rabbit ejaculate? *Animal Science* 44(2): 48-51.
- Soler, C., A. García-Molina, J. Contell, M. Silvestre, and M. Sancho. 2015. The TrumorphP® system: The new univ the morphology of living sperm. *Animal Reproduction Science* 158: 1-10.
- Swaigood, R., D. G. Lindburg, X. Zhou, and M. A. Owen. 2000. The effects of sex, reproductive condition and context on discrimination of conspecific odours by giant pandas. *Animal Behaviour* 60: 227-237.
- Theau-Clément, M., C. Castellini, L. Maertens, and C. Boiti. 1998. Bioestimations applied to rabbit reproduction: Theory and practice. *World Rabbit Science* 6(1): 179-184.
- Theau-Clément, M., G. Boleta, A. Sanchez, G. Saleil, and J. M. Brun. 2015. Some factors that influence semen characteristics in rabbits. *Animal Reproduction Science* 157: 33-38.
- Tussell, L., A. Legarra, M. García-Tomás, O. Rafel, J. Ramon, and M. Piles. 2011. Different ways to model biological relationships between fertility and pH of the semen in rabbits. *Journal of Animal Science* 89: 1294-1303.
- Tuttle E. M., and S. Pruett-Jones. 2004. Estimates of extreme sperm production: morphological and experimental evidence from reproductively promiscuous fairy-wrens (*Malurus*). *Animal Behaviour* 68: 541-550.
- Van Tilburg, M. F., M. A. M. Rodrigues, R. A. Moreira, F. B. Moreno, A. C. O. Monteiro-Moreira, M. J. D. Cândido, and A. A. Moura. 2013. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology* 79: 1247-1261.
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary y practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Villagran, C., J. Navarro, and V. O. Fuentes. 2003. Sexual exhaustion in White New Zealand male rabbits of different ages. *Animal Reproduction Science* 76: 251-255.
- Villaverde, A. E. Fiorattia, R. Ramos, R. Neves, J. Ferreira, G. Cardoso, P. M. Padilha, and M. Denise Lopes. 2014. Blood and seminal plasma concentrations of selenium, zinc and testosterone and their relationship to

- sperm quality and testicular biometry in domestic cats. *Animal Reproduction Science* 150: 50-55.
- Wessel, M. T., and G. C. Althouse. 2006. Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 94: 21-22.
- Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67: 661-672.
- WHO (World Health Organization). 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. WHO. Switzerland. 285p.
- Yániz, J. L., C. Soler, and P. Santolaria. 2015. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science* 156: 1-12.

3 COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL CONEJO EXPUESTO A HEMBRAS DE LA RAZA CALIFORNIA¹

3.1 Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de exponer hembras a machos como bioestímulo para mejorar sus potenciales reproductivos. Conejos California (n=24) de 18 meses de edad fueron asignados completamente al azar a dos tratamientos: 1) sin exposición de hembras o grupo control y; 2) con exposición de hembras durante 24 horas antes de la colección de semen. El diseño experimental fue completamente al azar con 12 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue el conejo. El estudio consistió de 11 sesiones en el que los machos fueron sometidos a una colecta de semen por semana con dos eyaculaciones por sesión. El análisis de varianza fue bajo un modelo mixto: tratamiento, orden de eyaculado y primer orden de interacción fueron fijos; y, efectos aleatorios de conejos; peso de los machos en cada colección y sesión como covariables. No se encontraron efectos ($p>0.05$) de tratamiento en la libido, características seminales y espermáticas y de cinética de espermatozoides pero el orden de eyaculado fue significativo ($p<0.05$) para la mayoría de las variables estudiadas. El tiempo de reacción, presencia de cola doblada y enrollada fueron 26, 38 y 30% mayores en el segundo eyaculado mientras que el volumen de eyaculado, espermatozoides normales con membrana intacta, motilidad total y progresiva, concentración espermática, espermatozoides vivos motiles con membrana intacta y número de dosis por eyaculado fueron 33, 10,12, 3, 33, 41 y 40% superiores en el primer eyaculado, respectivamente. La recomendación es incrementar los días de exposición de hembras para mejorar la libido y la calidad del semen del conejo.

Palabras clave: exposición de hembras, comportamiento reproductivo, conejos machos.

3.2 Abstract

The aim of the present study was to determine the influence of controlled doe exposure to males as a biostimulation alternative to improve their reproductive potential. California male rabbits (n=24), eighteen-month-old, were assigned randomly to two treatments: 1) without doe exposure or control group; 2) with doe exposure during 24 hours before semen collection. The experimental design was completely randomized with twelve replicates. The experimental unit was a buck. The study consisted of 11 sessions in which buck rabbits were subjected to one semen collection per week with two ejaculations per session. Analysis of variance was done with a mixed model: treatment, order of ejaculate and first order interaction were fixed; the effect of rabbit was random; body weight at each collection and session were covariables. There was no effect ($p>0.05$) of treatment on libido and seminal characteristics, but the order of ejaculation was significant ($p<0.05$) for most of the variables studied. Results showed that the reaction time, presence of bent and coiled tails were 25, 38 and 30% higher in the second ejaculate. Mean while, ejaculate volume, normal sperms with intact membrane, total and progressive motility, live motile sperms with intact membrane and number of doses per ejaculate were 33, 10, 12, 3, 33, 41 and 40% higher in the first ejaculate, respectively. The recommendation is to increase the days of doe exposure to improve libido and semen quality of male rabbits.

Keywords: doe exposure, reproductive behavior, male rabbits.

3.3 Introducción

La producción de carne de conejo se ha incrementado con rapidez a nivel mundial desde el año 2009; México, produce anualmente 4,360 toneladas y es el principal productor del norte y del centro de América (FAOSTAT, 2015). Según Theau-Clément *et al.* (1998), una mejora en la fertilidad de los conejos, tanto en el macho como en la hembra, incrementaría la productividad y la rentabilidad de la granja.

La contribución del macho se puede evaluar a través de la calidad de semen utilizado en la inseminación artificial. El IRRG (2005), indica que la calidad del semen de conejos varía en función de la frecuencia de colección, programas de luz, edad y salud del macho, y las estrategias de alimentación. Esta variación, aún en condiciones controladas requiere un monitoreo durante todo el año (Schneidgenová *et al.*, 2011).

Existen varias opciones para mejorar la calidad seminal, una de ellas es mediante la exposición de hembras al macho (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2010). La calidad seminal a una edad temprana así como a una edad avanzada resulta inadecuada para ser utilizada en la reproducción (Gogol *et al.*, 2002). A medida que se incrementa el peso corporal, también se incrementa el tiempo de eyaculación y los espermatozoides anormales; mientras que disminuye el volumen seminal y la concentración espermática y los espermatozoides normales (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se compara el semen de machos jóvenes con adultos entre los 23 y 44 semanas de edad, se encontró que los animales de edad avanzada tienen más espermatozoides móviles (Theau-Clément *et al.*, 2015).

El comportamiento reproductivo del macho fue más estudiado en machos de la raza Nueva Zelanda (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2010) que en los de la raza California o sus híbridos. Sin embargo, los programas de mejora genética también requieren información de la raza California y Chinchilla para trabajos en reproducción y mejora animal. En ese sentido, el objetivo principal del presente estudio fue determinar la influencia de la exposición de hembras a machos durante un período de 24 horas antes de la colección de semen, en la libido, características seminales y espermáticas y en la cinética de movimiento de los espermatozoides de conejos California maduros fértiles sometidos a un ritmo extensivo de reproducción.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Localización

El trabajo se realizó en “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A. C., localizado en el Valle de México a 19.5° N, 98.9° O y a una altitud de 2240 msnm. La temperatura media anual de la zona es de 15 °C y la precipitación pluvial es de 645 mm.

3.4.2 Animales, tratamientos y diseño experimental

Se utilizaron 24 conejos machos adultos California de 18 meses de edad. Los conejos fueron asignados completamente al azar a dos tratamientos: 1) sin exposición de hembras o grupo control y; 2) con exposición de hembras durante 24 horas antes de la colección de semen. El diseño experimental fue completamente al azar con 12 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue el conejo. Los conejos fueron sometidos a una colecta de semen por semana (ritmo extensivo) con dos eyaculaciones por sesión y fueron estudiados del 20 de abril al 29 de junio de 2015 durante la estación de verano.

Los conejos del tratamiento 2, fueron expuestos a hembras en periodo de receptividad con base en la coloración de la vulva (Easson, 2001). Las conejas fueron colocadas en una jaula individual frente a cada macho.

3.4.3 Instalaciones y ambiente

Los conejos fueron alojados en una unidad exclusiva para machos con ventilación natural y provista de aislamiento térmico. Los machos fueron mantenidos en jaulas metálicas galvanizadas individuales de 45 x 60 x 40 cm dispuestas en un sistema flat-deck o en línea, provistos de bebederos automáticos de tetina y comederos tipo inglés. Durante el experimento, en el ambiente se registró una temperatura máxima, mínima y promedio diaria de 23.4, 16.3 y 19.8 °C, respectivamente; mientras que la humedad relativa máxima, mínima y promedio diaria, fue de 76.8, 43.0 y 59.9%, respectivamente.

3.4.4 Manejo alimenticio

Los conejos fueron alimentados con base en una dieta comercial (Purina N) en forma de pellet con un contenido de 15.5% de proteína cruda, 2.0% de grasa, 15.0% de fibra cruda, 2,600 kcal de energía digestible por kg, 1.0% de calcio, 0.6% de fósforo y 9% de cenizas. A los animales se les proporcionó de 120 a 160 g de alimento balanceado diariamente de acuerdo a su peso vivo.

3.4.5 Tiempo de reacción y colección de semen

En cada sesión se evaluó el comportamiento reproductivo y la calidad seminal. El comportamiento sexual del macho o libido se midió a través del tiempo de reacción y la calidad seminal a través de características seminales macroscópicas, viabilidad y cinética espermática. El tiempo de reacción fue una unidad de conducta registrada desde la introducción de la coneja de apoyo en la jaula del macho hasta la eyaculación de éste (Quera y Losada, 2014). La colección de semen fue realizada una vez por semana con dos eyaculaciones sucesivas. La primera eyaculación fue inducida entre las once y quince horas de cada día y la segunda aproximadamente cinco minutos después. La colección de semen se realizó con una vagina artificial tipo inglés de acuerdo a la metodología descrita por Rodríguez-De Lara *et al.* (2003). El semen de cada eyaculado se mantuvo a 32 °C en baño María para luego evaluarse las características seminales macroscópicas y microscópicas elegidas y que se mencionan a continuación.

Las características seminales macroscópicas que se observaron fueron: presencia de gel, volumen (mL) y pH, de acuerdo con lo realizado por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011) y Rodríguez-De Lara *et al.* (2015). Las muestras de semen que presentaron gel, fueron desprovistas de éste inmediatamente. Posteriormente, se midió el volumen de semen en el mismo tubo colector transparente graduado a intervalos de 0.2 mL, que formaba parte de la vagina artificial. Se consideró como volumen de eyaculado también las muestras de semen que incluyeron orina. El pH de semen se midió con cintas de papel pH-métrica que varía entre 7 a 12 a intervalos de 1 grado (Dual Tint).

3.4.6 Viabilidad espermática

La condición de las membranas espermáticas se evaluó inmediatamente después de colectado el semen mediante la técnica de tinción con eosina-nigrosina (Holy, 1975). Las muestras fueron fijadas en portaobjetos de vidrio para su evaluación posterior. Las características evaluadas fueron: viabilidad y morfología. Las variables de viabilidad fueron expresadas en porcentaje

resultando las siguientes: espermatozoides vivos normales, vivos anormales, muertos normales y muertos anormales (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2015). En cada muestra de semen se evaluó un total de 200 espermatozoides.

3.4.7 Morfología, concentración, motilidad y cinética espermática

La evaluación visual de la apariencia sirvió para identificar el semen útil para su estudio posterior en el sistema CASA. Para evitar errores por colisión y dilución, se observó la apariencia del semen identificando el semen normal (acuoso, acuoso-cremoso, cremoso, cremoso-lechoso, lechoso) y con presencia de orina (amarillo-lechoso y ligeramente amarillento). Según las recomendaciones de Chenoweth y Lorton (2014), las muestras con presencia de orina fueron descartadas. El semen normal se diluyó con una solución salina fosfatada según proporciones que variaron entre 1/5 a 1/40 partes con relación al volumen. Seguidamente, con ayuda de una pipeta graduada, se tomaron 20 μL a partir de la muestra diluida y se vertió en una cámara Leja de 2 μm de espesor (Figura 3), para luego insertarlo en el equipo CASA (Figura 4). Finalmente, el equipo CASA, proporcionó los datos de morfología, concentración, motilidad y cinética espermática requeridos (Figuras 5 y 6). Las características morfológicas de concentración, motilidad y espermáticas cinéticas fueron evaluadas con el sistema de análisis seminal HT CASA II (Hamilton Thorne, 2013).

Las variables elegidas a partir de los datos procesados por el equipo CASA fueron la concentración espermática (millones de espermatozoides/mL), cantidad de espermatozoides/eyaculado (millones de espermatozoides), presencia de gota citoplasmática proximal y distal (%), espermatozoides con cola doblada y enrollada (%), motilidad total y progresiva (%) y las variables cinéticas de los espermatozoides: velocidad lineal, curvilínea y promedio ($\mu\text{m/s}$); índice de rectitud, de linealidad, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y de estabilidad (%), y la frecuencia de batida (Hz). Las variables fueron seleccionadas con base en las publicaciones realizadas por Theau-Clément *et al.* (2015), Sabés-Alsina *et al.* (2015) y Castellini *et al.* (2013).

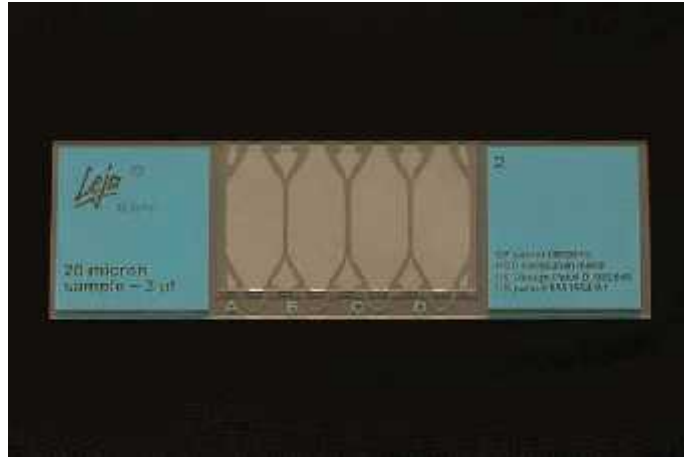


Figura 3. Cámara de Leja® usada en sistemas CASA.
Foto por L. Lorton (Chenoweth y Lorton *et al.*, 2014).

3.4.8 Dosis de semen

A partir de los datos de volumen de semen, concentración espermática, motilidad progresiva y espermatozoides vivos normales, se obtuvo la cantidad de dosis de semen a obtenerse por cada eyaculado.

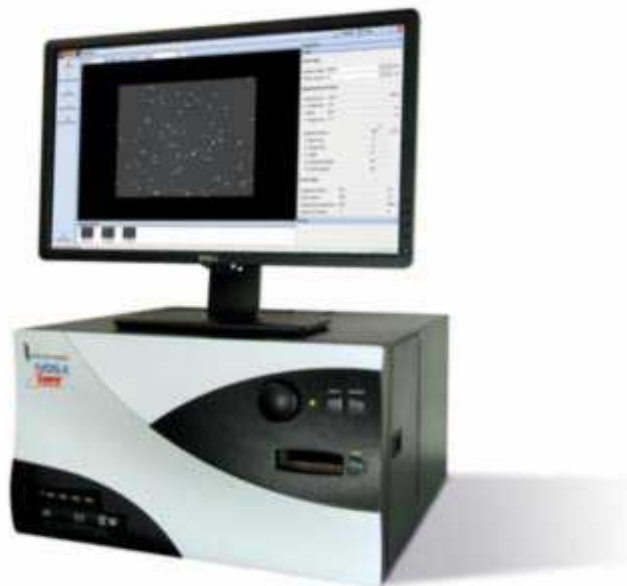


Figura 4. Equipo analizador de semen asistido por computadora (CASA).
Tomado de IMV Technologies (2015).

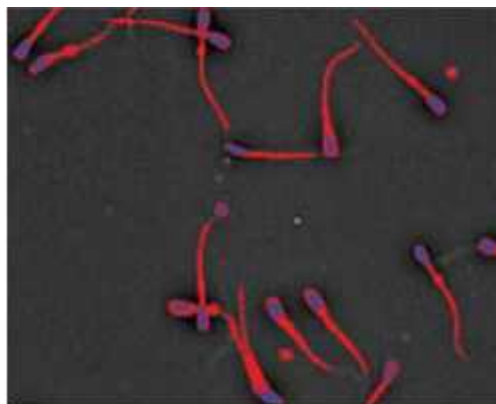


Figura 5. Iluminación interactiva de los espermatozoides para la diferenciación de la cabeza y cola.

Tomado de IMV Technologies (2015).

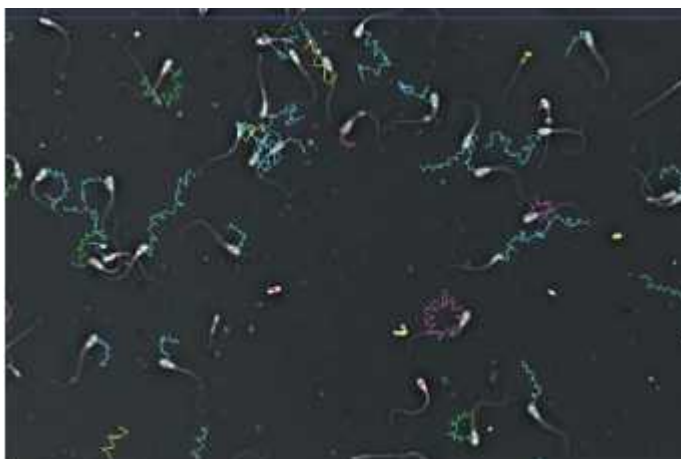


Figura 6. Determinación de la movilidad espermática en el equipo CASA.

Tomado de IMV Technologies (2015).

3.4.9 Variables de respuesta

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Comportamiento sexual o libido: tiempo de reacción.
- Características seminales: volumen y pH.

- Viabilidad espermática: espermatozoides vivos normales.
- Concentración espermática (millones de espermatozoides/mL).
- Morfología espermática: presencia de gota proximal y distal citoplasmática (%), espermatozoides con cola doblada y enrollada (%).
- Características de movimiento: motilidad total y progresiva (%).
- Cinética espermática: velocidad lineal, curvilínea y promedio ($\mu\text{m/s}$); índice de rectitud, de linealidad, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y de estabilidad (%), y la frecuencia de batida (Hz).
- Dosis de semen: número de dosis de semen por eyaculado.

3.4.10 Análisis estadístico

Las variables medidas en porcentaje fueron transformadas teniendo en cuenta la relación arco seno. El tiempo de reacción y las variables de concentración espermáticas, fueron transformados con base en la relación log 10 mientras que para los valores de pH, se usó la relación raíz cuadrada.

El tiempo de reacción, las características seminales y de los espermatozoides, fueron sometidos al análisis de varianza considerando el modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + E_j + M_k + T^*E_{ij} + b_1X_{1ijkl} + b_2X_{2ijkl} + \epsilon_{ijkl};$$

donde Y_{ijkl} , es la variable respuesta; μ , es la media general; T_i , es el efecto fijo del i -ésimo tratamiento (i = sin y con bioestímulo); E_j , es el efecto fijo del j -ésimo eyaculado (j = primero, segundo); M_k , es el efecto aleatorio del k -ésimo macho ($k=1, \dots, 22$) $\sim \text{NI}(0, s_i^2)$; T^*E_{ij} , es el efecto de la interacción entre tratamiento y orden de eyaculado; b_1 y b_2 , son los coeficientes de los efectos lineales de la covariable peso vivo X_{1ijkl} o sesión X_{2ijkl} en el momento de la colección de semen; y ϵ_{ijkl} , es el residual $\sim \text{NI}(0, s_e^2)$.

Las interacciones y covariables que no resultaron significativas estadísticamente ($p>0.05$), fueron removidas del modelo final. Los cálculos estadísticos fueron

realizados con PROC MIXED y las comparaciones fueron realizadas con el enunciado LSMEANS (SAS, 2011).

En vista de que el análisis estadístico con los datos no transformados fue similar al de los datos transformados, se prescindió de éstos últimos para el informe de los resultados.

3.5 Resultados y discusión

Durante el experimento dos conejos murieron por problemas respiratorios, por lo que la información analizada proviene de 11 conejos y 242 eyaculados por tratamiento ($n=484$). Los estadísticos descriptivos y los coeficientes de variación para peso de los conejos, tiempos de reacción, características seminales y espermáticas, y cinética de movimiento de los espermatozoides son mostrados en el Cuadro 5. Los datos corresponden a variables cuyas medidas de tendencia central y de dispersión son comparables a las reportadas por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011), Castellini *et al.* (2013), Maya-Soriano *et al.* (2015), Rodríguez-De Lara *et al.* (2015), Sabés-Alsina *et al.* (2015), y Theau-Clement *et al.* (2015).

Los efectos de la exposición de hembras y orden de eyaculado son mostrados en el Cuadro 6. El tiempo de reacción y el porcentaje de espermatozoides normales con membrana intacta (ENMI) fueron ajustados como covariable a un peso de los machos de 3600 g mientras que el volumen de eyaculado, ENMI, porcentaje de gota citoplasmática distal, concentración espermática por eyaculado, índice de linealidad e índice de estabilidad fueron ajustados por la covariable sesión a 6.2. No se encontraron efectos ($p>0.05$) de tratamiento en el tiempo de reacción y en las características seminales, espermáticas y de cinética de los espermatozoides. Sin embargo, el orden de eyaculado afectó ($p<0.01$) la mayor parte de estas variables de estudio, pero no las características inherentes a la motilidad cinética.

Cuadro 5. Estadísticos descriptivos del peso vivo, tiempo de reacción, características seminales y espermáticas.

Variable	N	Promedio	DE	Mínimo	Máximo	CV
Peso vivo (kg)	484	3.6	0.2	3.0	4.0	6.0
Tiempo de reacción (s)	467	15.0	10.1	2.6	84.2	67.5
Variables seminales						
pH	466	6.6	0.2	6.0	7.0	3.3
Volumen de eyaculado (mL)	466	0.5	0.3	0.1	1.6	65.0
Variables espermáticas						
Motilidad total (%)	412	54.2	21.3	1.4	96.6	39.3
Motilidad progresiva (%)	409	32.4	17.6	0.2	78.9	54.3
ENMI ^z (%)	412	61.4	13.8	22.0	89.7	22.4
Gota citoplasmática distal (%)	413	12.4	7.0	1.4	41.2	56.2
Cola doblada (%)	412	3.8	2.8	0.2	27.6	74.0
Cola enrollada (%)	402	2.3	2.2	0.1	22.6	94.5
Concentración (millones/mL)	413	576.1	321.4	30.8	1,911.8	55.8
Concentración (millones/eyaculado)	413	236.8	194.9	8.3	1,204.4	82.3
ENMI ^z (millones/eyaculado)	408	55.1	67.1	0.0	422.5	121.7
Variables de cinética espermática						
VSL ^x (µm/s)	412	76.2	23.2	1.5	122.6	30.5
VCL ^w (µm/s)	412	172.1	30.6	30.6	268.0	17.8
VAP ^v (µm/s)	412	93.9	22.9	21.6	150.2	24.4
STR ^u	412	79.2	10.8	6.9	96.0	13.6
LIN ^t	412	45.7	11.8	1.6	84.6	25.7
ALH ^s (µm)	412	7.0	1.3	1.6	11.3	19.1
WOB ^r (%)	412	55.2	8.9	23.1	87.0	16.1
BCF ^q (Hz)	412	36.4	5.2	25.4	99.1	14.3
Número de dosis por eyaculado	408	2.8	3.4	0.0	21.1	121.7

^zEspermatozoides normales con membrana intacta, ^xVelocidad lineal, ^wVelocidad curvilínea, ^vVelocidad promedio, ^uÍndice de rectitud, ^tÍndice de linealidad, ^sAmplitud desplazamiento lateral de la cabeza, ^rÍndice de estabilidad, ^qÍndice de frecuencia de batida.

Cuadro 6. Medias^z ($\pm$ error estándar) para el efecto de exposición de hembras y orden de eyaculado en el tiempo de reacción, características seminales y espermáticas.

Variable	Tratamiento			Eyaculado		
	Sin hembra	Con hembra	Valor <i>p</i>	Primero	Segundo	Valor <i>p</i>
Tiempo de reacción (s) ^c	15.5 $\pm$ 0.9 ^a	14.5 $\pm$ 0.9 ^a	0.4554	13.3 $\pm$ 0.8 ^b	16.7 $\pm$ 0.8 ^a	0.0010
Variables seminales						
pH	6.6 $\pm$ 0.02 ^a	6.6 $\pm$ 0.02 ^a	0.8834	6.6 $\pm$ 0.02 ^a	6.6 $\pm$ 0.02 ^a	0.1177
Volumen de eyaculado (mL) ^d	0.4 $\pm$ 0.04 ^a	0.5 $\pm$ 0.04 ^a	0.4953	0.6 $\pm$ 0.03 ^a	0.4 $\pm$ 0.03 ^b	0.0001
Variables espermáticas						
Motilidad total (%)	55.9 $\pm$ 4.4 ^a	53.4 $\pm$ 4.5 ^a	0.6899	57.6 $\pm$ 3.2 ^a	51.7 $\pm$ 3.2 ^b	0.0008
Motilidad progresiva (%)	32.5 $\pm$ 3.4 ^a	32.6 $\pm$ 3.4 ^a	0.9894	34.7 $\pm$ 2.5 ^a	30.4 $\pm$ 2.5 ^b	0.0050
ENMI (%) ^y ^{cd}	61.6 $\pm$ 3.4 ^a	61.2 $\pm$ 3.4 ^a	0.9267	62.3 $\pm$ 2.4 ^a	60.5 $\pm$ 2.4 ^b	0.0069
Gota citoplasmática distal (%) ^d	13.6 $\pm$ 1.3 ^a	11.2 $\pm$ 1.3 ^a	0.2098	12.2 $\pm$ 1.0 ^a	12.6 $\pm$ 1.0 ^a	0.4770
Cola doblada (%)	3.7 $\pm$ 0.4 ^a	3.9 $\pm$ 0.4 ^a	0.7722	3.2 $\pm$ 0.3 ^b	4.4 $\pm$ 0.3 ^a	0.0001
Cola enrollada (%)	2.2 $\pm$ 0.3 ^a	2.4 $\pm$ 0.3 ^a	0.6883	2.0 $\pm$ 0.3 ^b	2.6 $\pm$ 0.3 ^a	0.0113
Concentración (millones/mL)	573.2 $\pm$ 26.8 ^a	592.0 $\pm$ 27.5 ^a	0.4610	586.5 $\pm$ 25.2 ^a	568.6 $\pm$ 24.3 ^a	0.5732
Concentración millones/eyaculado) ^d	232.0 $\pm$ 16.5 ^a	246.4 $\pm$ 16.9 ^a	0.5487	286.4 $\pm$ 15.2 ^a	192.0 $\pm$ 14.7 ^b	0.0001
ENMI (millones/eyaculado) ^y	53.0 $\pm$ 9.7 ^a	58.6 $\pm$ 9.8 ^a	0.6890	70.1 $\pm$ 7.5 ^a	41.4 $\pm$ 7.4 ^b	0.0001
Variables de Cinética espermática						
VSL (μ m/s) ^x	75.7 $\pm$ 4.2 ^a	77.4 $\pm$ 4.2 ^a	0.7712	75.5 $\pm$ 3.1 ^a	77.6 $\pm$ 3.1 ^a	0.2923
VCL (μ m/s) ^w	170.7 $\pm$ 5.8 ^a	175.5 $\pm$ 5.8 ^a	0.5643	172.8 $\pm$ 4.3 ^a	173.4 $\pm$ 4.3 ^a	0.8278
VAP (μ m/s) ^v	92.4 $\pm$ 4.3 ^a	96.5 $\pm$ 4.4 ^a	0.5114	93.1 $\pm$ 3.2 ^a	95.8 $\pm$ 3.2 ^a	0.1559
STR ^u	79.7 $\pm$ 1.6 ^a	78.5 $\pm$ 1.6 ^a	0.6151	79.3 $\pm$ 1.3 ^a	79.0 $\pm$ 1.2 ^a	0.7687
LIN ^{td}	45.9 $\pm$ 1.9 ^a	45.5 $\pm$ 1.9 ^a	0.9108	45.2 $\pm$ 1.5 ^a	46.2 $\pm$ 1.4 ^a	0.3036
ALH (μ m) ^s	7.0 $\pm$ 0.2 ^a	7.1 $\pm$ 0.2 ^a	0.7357	7.0 $\pm$ 0.2 ^a	7.0 $\pm$ 0.2 ^a	0.9355
WOB (%) rd	55.0 $\pm$ 1.5 ^a	55.5 $\pm$ 1.5 ^a	0.8306	54.6 $\pm$ 1.1 ^a	55.9 $\pm$ 1.1 ^a	0.0927
BCF (1/s) ^q	36.0 $\pm$ 0.5 ^a	36.7 $\pm$ 0.5 ^a	0.3371	36.3 $\pm$ 0.4 ^a	36.4 $\pm$ 0.4 ^a	0.7846
Número de dosis/eyaculado	2.6 $\pm$ 0.5 ^a	2.9 $\pm$ 0.5 ^a	0.6890	3.5 $\pm$ 0.4 ^a	2.1 $\pm$ 0.4 ^b	0.0001

^zMedias sin una letra en común, dentro de las columnas^{ab} son diferentes ($p \leq 0.05$).

^yEspermatozoides normales con membrana intacta, ^xVelocidad lineal, ^wVelocidad curvilínea, ^vVelocidad promedio, ^uÍndice de rectitud, ^tÍndice de linealidad, ^sAmplitud desplazamiento lateral de la cabeza, ^rÍndice de estabilidad, ^qÍndice de frecuencia de batida.

^cPeso vivo y ^dsesión son covariables.

El tiempo de reacción, las características seminales, características espermáticas, de cinética así como el número de dosis por eyaculado mostrados en el Cuadro 6, no son consistentes con los reportados por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), quienes encontraron que la exposición permanente de hembras a conejos de la raza Nueva Zelanda durante 14 semanas mostró un mejor comportamiento reproductivo expresado en un menor tiempo de reacción, aumento en el volumen de semen, mayor motilidad espermática, más espermatozoides por eyaculado, más espermatozoides móviles vivos normales y mayor dosis de semen. Por lo que, los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que la exposición de hembras de un día para otro de la colección de semen (24 horas) no es estímulo suficiente para mejorar el comportamiento sexual y reproductivo de los machos. Esto plantea realizar más estudios incrementando los tiempos de exposición controlada de hembras, a fin de demostrar que existe efecto contrario en la raza California con relación a la Nueva Zelanda.

El tiempo de reacción en el presente estudio se incrementó ($p<0.01$) en 3.4 s con respecto al primer eyaculado (13.3 ± 0.8). Los tiempos de reacción son superiores a los reportados por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011) y por Rodríguez-De Lara *et al.* (2015).

El volumen de eyaculado disminuyó ($p<0.001$) en 0.2 mL con relación al primer eyaculado (0.6 ± 0.03). Los volúmenes de eyaculado también son inferiores a los reportados por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011) y por Rodríguez-De Lara *et al.* (2015). La motilidad total y progresiva disminuyeron ($p<0.01$) en 5.9 y 4.3%, respectivamente con respecto a los valores de 57.6 ± 3.2 y de $34.7\pm2.5\%$ correspondientes al primer eyaculado. Con relación a la motilidad total, ésta tuvo un rango de variación ligeramente inferior a los de Theau-Clement *et al.* (2015), Sabés-Alsina *et al.* (2015) y Maya-Soriano *et al.* (2015); asimismo, resultó ser similar a los de Castellini *et al.* (2013). Considerando la motilidad progresiva, los resultados fueron ligeramente inferiores a los de Theau-Clement

et al. (2015) y Maya-Soriano *et al.* (2015), pero resultaron superiores a los reportados por Sabes-Alsina *et al.* (2015).

En el caso del porcentaje de espermatozoides normales con membrana intacta, ésta disminuyó ($p<0.01$) en 1.8% con relación al primer eyaculado (62.3 ± 2.4). Asimismo, el porcentaje de espermatozoides normales con membrana intacta son inferiores a los reportados por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010) y por Rodríguez-De Lara *et al.* (2015) pero similares a Fallas-López *et al.* (2011). Las variables morfológicas que indican la presencia de espermatozoides con cola doblada y cola enrollada, se incrementaron ($p<0.001$ y $p<0.05$, respectivamente) en 1.2 y 0.6% con respecto al primer eyaculado (3.2 ± 0.3 y $2.0\pm0.3\%$, respectivamente). Estos resultados son inferiores a los registrados por Sabés-Alsina *et al.* (2015).

La concentración espermática expresada en millones de espermatozoides por eyaculado, disminuyó ($p<0.001$) en 94.4 millones con relación al primer eyaculado (286.4 ± 15.2). Los valores obtenidos son similares a las concentraciones de Theau-Clement *et al.* (2015) y superiores a los de Sabés-Alsina *et al.* (2015).

Los valores obtenidos de espermatozoides motiles con membrana intacta disminuyeron ($p<0.001$) en 28.7 millones por eyaculado con relación al primer eyaculado (70.1 ± 7.5). Estos resultados son inferiores a los reportados por Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011) y Rodríguez-De Lara *et al.* (2015). Finalmente, cuando se evaluó el número de dosis a obtenerse para inseminación artificial por eyaculado, ésta disminuyó ($p<0.001$) en 1.4 dosis con relación al primer eyaculado (3.51 ± 0.4). Estos resultados son inferiores a los que obtuvieron Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), Fallas-López *et al.* (2011) y Rodríguez-De Lara *et al.* (2015).

Se encontró un efecto ($p<0.05$) de interacción entre tratamiento y orden de eyaculado para la motilidad total (Cuadro y Figura 7). En el caso del primer eyaculado se encontró que la presencia de hembras disminuyó ($p<0.001$) la

motilidad total en un 9.9%; mientras que en el segundo eyaculado, los porcentajes de motilidad fueron similares entre conejos expuestos o no a hembras. Las diferencias de motilidad para el primer orden de eyaculado no son claras, porque se esperaría que la exposición de hembras hubiera mejorado esta característica por lo que se sugiere realizar mayor número de estudios.

Cuadro 7. Medias^z ($\pm$ error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculado sobre la motilidad total.

Variable	Primer eyaculado		Segundo eyaculado		Valor <i>p</i>
	Sin hembra	Con hembra	Sin hembra	Con hembra	
Motilidad total (%)	60.6 $\pm$ 4.6 ^a	54.6 $\pm$ 4.6 ^b	51.2 $\pm$ 4.6 ^b	52.2 $\pm$ 4.6 ^b	0.0295

^zMedias sin una letra en común^{ab}, dentro de las columnas son diferentes ($p \leq 0.05$).

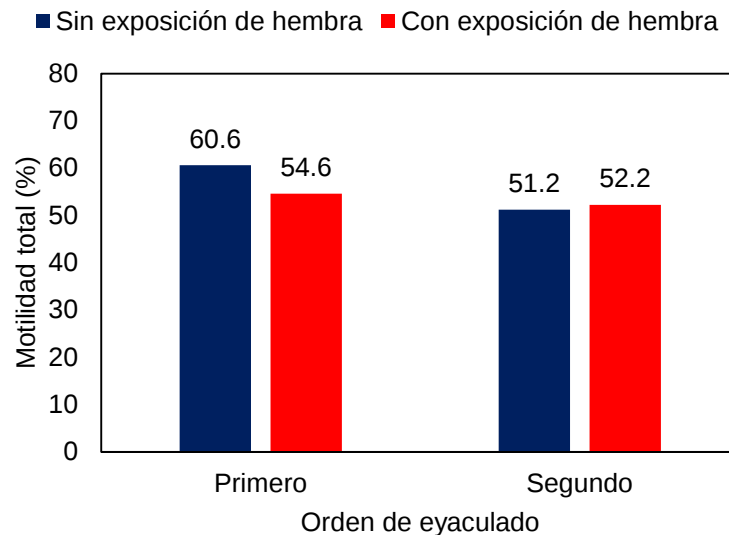


Figura 7. Influencia de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculado sobre la motilidad total.

En general, en el presente estudio, el primer eyaculado estuvo asociado con la mejora en la libido, mayor volumen y concentración por eyaculado que el segundo. Estos resultados concuerdan con los reportes de Amann (1966) y

Rodríguez-De Lara *et al.* (2010), pero difieren con respecto a la motilidad total y progresiva ya que en el presente estudio, el primer eyaculado fue mejor que el segundo. Los resultados de motilidad espermática, no concuerdan con los reportados por Battaglini *et al.* (1992). Diferencias entre estudios pueden ser atribuidas a diferencias de crianza y manejo (frecuencia de uso, instalaciones y alimentación) y al genotipo empleado.

Los conejos mostraron una gran variación en la libido, así como en las características seminales y espermáticas. Estos resultados están de acuerdo con los reportes de Theu-Clément *et al.* (1995), quienes plantearon la hipótesis de las diferencias individuales podrían deberse al genotipo.

3.6 Conclusión

El comportamiento reproductivo del conejo de la raza California no está influenciado por la exposición de la hembra al macho; sin embargo, se observó que existen diferencias en las variables seminales y espermáticas considerando el primer y segundo eyaculado.

3.7 Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar los estudios de Maestría en Ciencias y a “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A. C., por brindar sus instalaciones y facilidades técnicas para realizar el presente trabajo de investigación.

3.8 Literatura citada

- Amann, R. P. 1966. Effect of ejaculation frequency and breed on semen characteristics and sperm output of rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 11: 291-293.
- Battaglini, M., C. Castellini, and P. Lattaioli, 1992. Variability of the main characteristics of rabbit semen. *Journal of Applied Rabbit Research* 15: 439-446.
- Castellini, C., S. Mattioli, S. Ruggeri, A. Dal Bosco, and G. Collodel. 2013. The time-dependent effects of prostate granules and seminal plasma on the

- capacitation, acrosome reaction, and motility of rabbit sperm. *Animal Reproduction Science* 140: 97-102.
- Chenoweth, P. y Lorton, S. 2014. *Andrology*. CABI. UK. 595p.
- Fallas-López, M., R. Rodríguez-De Lara, R. Bárcena-Gama, M. T. Sánchez-Torres Esqueda, D. Hernández-Sánchez, P. A. Martínez-Hernández, and O. Aguilar-Romero. 2011. Rabbit sexual behavior, semen and sperm characteristics when supplemented with sprouted wheat. *Animal Reproduction Science* 129: 221-228.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2015. Browse data. http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/e. Consultada el 02 de diciembre de 2015.
- Gogol, P., M. Bochenek, and Z. Smora. 2002. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 92-95.
- Hamilton Thorne. 2013. HT CASA II Software Manual. Version 1.3. Hamilton Thorne, Inc. Beverly, MA, USA. 99 p.
- Holy C., L. 1975. *Biología de la Reproducción Bovina*. Revolucionaria. Vedado, La Habana. 484p.
- IMV Technologies. 2015. Next Generation CASA System. <http://www.imv-technologies.com/our-solutions/rabbit/detail/product/ivos-ii.1548.html>. Consultada el 01 de diciembre de 2015.
- IRRG (International Rabbit Reproduction Group). 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science* 13: 71-91.
- Maya-Soriano, M. J., E. Taberner, M. Sabés-Alsina, J. Ramon, O. Rafel, L. Tusell, M. Piles, and M. López-Béjar. 2015. Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. *Theriogenology* 84: 384-389.
- Quera, V., y J. L. Losada. 2014. *Etología*. 1ª. ed. UOC. Barcelona. 520p.
- Rodríguez-De Lara, M. López-Fallas, R. Rangel-Santos, and V. Mariscal-Aguayo. 2003. Influence of short-term relocation and male exposure on sexual receptivity and reproduction in artificially inseminated lactating doe rabbits. *Animal Reproduction Science* 78: 111-121.
- Rodríguez-De Lara, J. Noguez-Estrada, R. Rangel-Santos, J. G. García-Muñiz, P. A. Martínez-Hernández, M. Fallas-López, and E. Maldonado-Siman. 2010. Controlled doe exposure as biostimulation of buck rabbits. *Animal Reproduction Science* 122: 270-275.
- Rodríguez-De Lara, R., M. Fallas-López, J. G. García-Muñiz, P. A. Martínez-Hernández, R. Rangel-Santos, E. Maldonado-Siman, and J. A. Cadena-Meneses. 2015. Sexual behavior and seminal characteristics of fertile mature New Zealand White male rabbits of different body weights. *Animal Reproduction Science* 152: 90-98.

- Sabés-Alsina, M., N. Planell, E. Torres-Mejia, E. Taberner, M. J. Maya-Soriano, L. Tusell, J. Ramon, A. Dalmau, M. Piles, and M. Lopez-Bejar. 2015. Daily exposure to summer circadian cycles affects spermatogenesis, but not fertility in an *in vivo* rabbit model. *Theriogenology* 83: 246-252.
- SAS (Statistical Analysis System Institute). 2011. Base SAS® 9.3 Procedures Guide: Statistical Procedures. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 536 p.
- Schneidgenová, M., J. Vašíček, P. Čupka, and P. Chrenek. 2011. Is it necessary to control seasonal quality of the rabbit ejaculate? *Animal Science* 44 (2): 48-51.
- Theau-Clément, M., C. Castellini, L. Maertens, and C. Boiti. 1998. Bioestimulations applied to rabbit reproduction: theory and practice. *World Rabbit Science* 6 (1): 179-184.
- Theau-Clément, M., N. Michel, J. Esparbié, and G. Bolet. 1995. Effect of artificial photoperiods on sexual behaviour and sperm output in the rabbit. *Animal Science* 60: 143-149.
- Theau-Clément, M., G. Boleta, A. Sanchez, G. Saleil, and J. M. Brun. 2015. Some factors that influence semen characteristics in rabbits. *Animal Reproduction Science* 157: 33-38.