



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL**

**EVALUACIÓN DE TRES DILUYENTES SOBRE LA  
PRESERVACIÓN DEL SEMEN DE CONEJO A 5°C.**

**TESIS**

Que presenta:

**Diana Laura Canché Martín**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**Ingeniera en Agronomía**

Director de tesis:

**Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo**

Conkal, Yucatán, México

Septiembre, 2022



**TecNM**

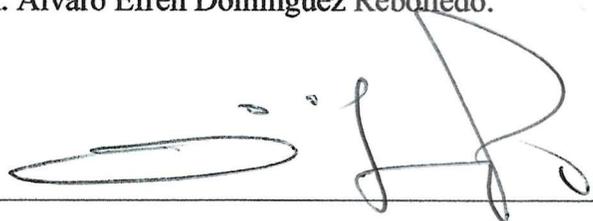


La presente Tesis fue realizada por Diana Laura Canché Martín de la carrera de Ingeniería en Agronomía, con orientación en Producción pecuaria y con el número de control 15800121, con el título "Evaluación de tres diluyentes sobre la preservación del semen de conejo a 5 °C", la cual fue dirigida , asesorada y revisada por el comité que fue asignado en su oportunidad, y cuyos integrantes firman su consentimiento para que este trabajo sea presentado como requisito parcial para la titulación , de acuerdo al Proceso de titulación Integral y al Manual de Lineamientos

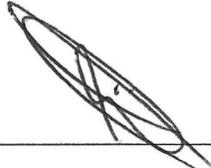
Académicos Administrativos del Tecnológico Nacional de México.

Director:  \_\_\_\_\_

DR. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo.

Asesor:  \_\_\_\_\_

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde.

Revisor:  \_\_\_\_\_

Dr. Edgar Aguilar Urquizo.

Conkal, Yucatán. septiembre 2022.

## DEDICATORIA

A mis padres por su inmenso apoyo en cada uno de mis proyectos; a Elías por ser parte importante de todo este proceso ayudándome a no darme por vencida y sobre todo a Emmanuel porque vives en nosotros.

Diana.

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia doy gracias a Dios por permitir que llegue hasta aquí, a pesar de las circunstancias, de igual forma a mi familia porque todos ellos fueron parte importante en mi desarrollo como persona y en el ámbito profesional.

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento otorgado a través del proyecto TecNM 11088.21-P.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por permitirme el uso de las instalaciones para la fase experimental del presente trabajo de investigación.

A mi comité de tesis integrado por: Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo y el Dr. Edgar Agilar Urquiza por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias en el amplio campo de la investigación y contribuir a mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio Isaid Bazilio, Andrea Gamboa, Itzel Rodríguez y Meliza Estrella gracias a ellos el trabajo se hizo más ameno y me llevo grandes amigos.

Gracias a mis amigos de universidad Dariane Can, Diego Ascencio y Luis Novelo que fueron parte importante para que llegara hasta donde estoy, por sus consejos, pláticas y apoyo en cada paso que daba.

Por último, pero no menos importante gracias a mi compañero, amigo y pareja Elías Cámara por estar conmigo en cada momento por que sin el cómo apoyo no hubiera llegado hasta el INIFAP campus Mocochoá.

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar tres diluyentes comerciales, en la preservación del semen de conejo a 5 °C durante 72 horas. Los eyaculados se obtuvieron de 4 conejos de la raza Nueva Zelanda mediante vagina artificial, los cuales se mezclaron y dividieron en 3 tratamientos: T1 (AndroMed®); T2 (Optixcell®) y tratamiento testigo (TT): Tris-ácido cítrico (TCG). Se analizaron los parámetros espermáticos de motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), viabilidad, actividad mitocondrial (AM) e integridad del acrosoma (IA) a las 0, 24, 48 y 72 horas. Los datos se analizaron con un ANOVA y una prueba de Tukey para la comparación de medias. La MT fue mayor ( $P<0.05$ ) y similar en el T1 y T2, respecto al TT a la 0, 24 y 48 h, mientras que a las 72 h el T2 fue el que mayor MT presentó. La MP fue mayor en el T1 y T2 que el TT en todas las horas. La viabilidad espermática fue superior ( $P<0.05$ ) y similar en el T1 y T2, respecto al TT a las 24, 48 y 72 h. En la actividad mitocondrial, el T1 y T2 fueron similares y superiores ( $P<0.05$ ), respecto al TT a las 0, 48 y 72 h, mientras que a las 24 h el T2 fue mayor respecto al T1 y TT. En la integridad de los acrosomas no se presentaron diferencias entre los tratamientos. De 0 a 72 h, únicamente la actividad mitocondrial y la integridad del acrosoma se mantuvieron a través del tiempo en los tres diluyentes. En conclusión, los diluyentes OPTIXcell® y Triladyl® son los que mejor preservan el semen de conejo Nueva Zelanda a 5 °C durante 72 h.

Palabras clave: Conejo, diluyente, preservación, semen.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate three commercial extenders in the preservation of rabbit semen at 5 °C for 72 hours. Ejaculates were obtained from 4 New Zealand breed rabbits by artificial vagina, which were mixed and divided into 3 treatments: T1 (AndroMed®); T2 (Optixcell®) and control treatment (TT): Tris-citric acid (TCG). Individual motility (IM), progressive motility (PM), viability, mitochondrial activity (MA) and acrosome integrity (AI) were analyzed at 0, 24, 48 and 72 hours. The data was analyzed with an ANOVA and a Tukey test for the comparison of means. MT was higher ( $P<0.05$ ) and similar in T1 and T2, with respect to TT at 0, 24 and 48 h, while at 72 h T2 had the highest MT. MP was higher in T1 and T2 than TT at all hours. Viability was higher ( $P<0.05$ ) and similar in T2 and T1, respect to TT at 24, 48 y 72 h. Mitochondrial activity in T1 and T2 were similar and superior ( $P<0.05$ ), respect to TT at 0, 48 and 72 h, while at 24 h T1 was higher respect to T2 and TT. No differences were observed in the integrity of the acrosomes. Mitochondrial activity and Host decreased over time in a similar way in all three extenders. In conclusion, OPTIXcell® and Triladyl® proved to be the best extenders to preserve New Zealand rabbit semen at 5 °C for 72 h.

Key words: Rabbit, extenders, preservation, semen.

## INDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	9
<b>1.1.- Antecedentes del problema:</b>	10
<b>1.2.- Planteamiento del problema:</b>	13
<b>1.3.- Justificación del problema:</b>	14
<b>II.- Objetivos e Hipótesis:</b>	14
<b>2.1.- Objetivo general:</b>	15
<b>2.1.2.- Objetivo específico:</b>	15
<b>2.2.- Hipótesis:</b>	15
<b>III.- FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	16
<b>3.1.- Fisiología reproductiva:</b>	16
<b>3.2.- Características del semen:</b>	17
<b>3.2.1.- Características del espermatozoide:</b>	17
<b>3.3.- Evaluación seminal:</b>	18
<b>3.3.1.- Evaluación macroscópica:</b>	19
<b>3.3.2.- Evaluación microscópica:</b>	19
<b>3.3.2.1.- Viabilidad:</b>	19
<b>3.3.2.2.- Motilidad:</b>	20
<b>3.3.2.3.- Morfología:</b>	20
<b>3.3.2.4.- Concentración espermática:</b>	21
<b>3.3.2.5.- Integridad acrosomal:</b>	21
<b>3.4.- Conservación espermática:</b>	22
<b>3.5.- Diluyentes:</b>	23

<b>3.5.1.- Componentes de los diluyentes:</b>	23
<b>3.5.1.1.- Sustratos energéticos:</b>	24
<b>3.5.1.2.- Agentes proteicos:</b>	25
<b>3.5.1.3.- Agentes reguladores de PH:</b>	26
<b>3.5.1.4.- Agentes crioprotectores:</b>	27
<b>3.5.2.- Tipos de Diluyentes:</b>	27
<b>3.5.2.1.- AndroMed® a base de lecitina de soya:</b>	27
<b>3.5.2.2.- Optixcell® a base de liposomas:</b>	28
<b>3.5.2.3.- TCG (Tris- ácido cítrico - glucosa):</b>	29
<b>IV.- DESARROLLO DEL PROYECTO</b>	30
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	33
<b>5.1.- Resultados:</b>	33
<b>5.2.- Discusión:</b>	35
<b>5.3.- Conclusión:</b>	36
<b>VI.- BIBLIOGRAFIA</b>	37

### INDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1 : colecta</i> .....	30
<i>Ilustración 2: viabilidad</i> .....	31
<i>Ilustración 3: Integridad acrosomal</i> .....	31
<i>Ilustración 4: Integridad mitocondrial</i> .....	32

### INDICE DE TABLA

Tabla 1: Porcentaje (%) de los parametros espermaáticos evaluados a las 0 hr y a las 6 (media ± error estándar).....	34
--	----

## I.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- Antecedentes del problema:

Hoy en día, la industria de la carne de conejo es de gran importancia debido a que se considera una alternativa para contrarrestar el desabasto de alimento a nivel mundial.

La producción cunícola es una de las actividades más rentables alrededor del mundo, según datos de la FAO en 2010, reporta que China ocupa el primer puesto en producción de carne de conejo, seguido de países como España, Francia, Venezuela, Italia y Corea del Norte. El principal objetivo de esta disciplina es la producción de carne, aunque igual en menor medida se aprovecha la piel y el pelo en la industria de la moda, entre otros.

Debido a la fuerte demanda que ha representado la cunicultura en los últimos años, se ha visto un gran interés y avance por la difusión de la inseminación artificial (IA), la cual facilita la utilización del material genético de animales sobresalientes.

En México, la actividad cunícola ha tenido un desarrollo limitado (Torres, 2012). Existen en el país aproximadamente 10 mil productores, con un inventario de 203 mil 125 vientres cunícolas y que producen siete mil 700 toneladas anuales de conejo, en las razas Nueva Zelanda Blanco y California, y para la peletería las razas Chinchilla, Mariposa, Satinado Rojo, Azteca Negro y la línea FES-Cuautitlán. (SADER, 2013). Con una producción superior a las 2 mil toneladas de carne de conejo, el Estado de México se posiciona como líder nacional en la materia, concentrando los mayores índices en municipios como Amecameca, Texcoco, la zona del Valle de Toluca, así como Jilotepec y Atlacomulco. A

nivel internacional México ocupa el décimo octavo lugar en su producción con poco más de 4 mil 500 toneladas anuales. (Mata, 2018).

La investigación en la cunicultura ha sido escasa en el país y se ha generado de manera desarticulada y dispersa; además de no aprovechar los beneficios biológico-económicos que ofrece la especie, como son: tamaño pequeño, reducida necesidad de espacio, consumo de alimentos con un alto contenido de fibra, alta eficiencia y conversión alimenticia, elevada prolificidad, ciclo reproductivo corto y amplio grado de diversidad genética. Aspectos que deben ser considerados, puesto que la maximización productiva del conejo está supeditada al control y manipulación de cada uno de los eventos biológicos típicos de la especie (Castellini, 2008).

La aplicación de técnicas de inseminación artificial ha generado ventajas sanitarias, de manejo, económicas, así como en el campo de la selección y mejora genética. La obtención de semen no es muy diferente a la empleada con otras especies (bovinos, ovinos, cerdos, entre otros.); cada muestra debe ser evaluada para su posterior utilización, el proceso de evaluación del semen es esencial ya que no todos los eyaculados poseen calidad suficiente como para fecundar a una hembra. (Vega, Barrio, Quintela, Becerra, Cainzos, et al. 2012).

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

Se utiliza diversos diluyentes para el semen que pueden ser comerciales o naturales, siendo lo importante sus características de mantenimiento del esperma, deben cumplir dos objetivos aumentar el volumen del eyaculado sin afectar la calidad seminal para aumentar el número

de inseminaciones y conservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el mayor tiempo posible (Bonet, 2009). El diluyente permite conservar las células espermáticas por su aporte nutritivo, efecto tampón, control de contaminación, etc.

Hasta ahora, se han desarrollado muchos protocolos y diluyentes para la criopreservación de espermatozoides de conejo. Sin embargo, los efectos ocasionados por el proceso de congelación-descongelación, limitan su utilización a un nivel comercial, debido a la disminución de la fertilidad y prolificidad obtenidas con el uso de semen criopreservado, en comparación con el uso de semen fresco (Hernández et al., 2004). No obstante, el uso de semen refrigerado a temperaturas intermedias (16 - 20 °C) o aún más bajas (5 °C), domina en diferentes especies. Para la conservación de espermatozoides de conejo, la refrigeración es el método más adecuado. Sin embargo, requiere que el semen pueda ser mantenido en condiciones tales, que aseguren una alta fertilidad de por lo menos 24 horas, tiempo en el cual se podrían transportar las dosis a una distancia considerable (Hernández et al 2004) manteniendo la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides (Puente y Tartaglioni 2013).

En conejos, el diluyente comúnmente utilizado para su preservación tanto en fresco como en refrigeración a 5 °C o 15 °C es el Tris- ácido cítrico (TCG), el cual está elaborado a base de Tris, ácido cítrico, glucosa y antibiótico (Viudes-de Castro et al., 1999). Sin embargo, cuando el semen de conejo se somete a congelación, al diluyente TCG se le tiene que agregar el crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO), el cual evita la formación de cristales de hielo. Asimismo, diferentes estudios han demostrado que la calidad del semen de conejo se criopreserva mejor cuando se utiliza el crioprotector DMSO que el glicerol.

Actualmente, existen en el mercado una gran variedad de diluyentes tanto para conejos como para otras especies, como el diluyente AndroMed (Minitube, Tiefenbach, Alemania), que es una concentración estéril a base de lecitina de soya mediante los cuales los fosfolípidos vegetales, protegen las membranas de los espermatozoides frente a los efectos perjudiciales causados por el shock frío (Muiño y Peña, 2009). Del mismo modo, está el diluyente OPTIXcell (imv, L'Aigle, Francia) que está compuesto a base de liposomas, hidratos de carbono, sales minerales, tampón, antioxidantes, glicerol, fosfolípidos, agua ultra pura, antibióticos (penicilina, estreptomicina, lincomicina y espectinomicina), no contiene proteínas de origen animal, neutralizando su efecto perjudicial sobre las membranas espermáticas protegiéndolas durante el proceso de enfriamiento y congelación (Manjunath et al., 2002). No obstante, aunque estos dos últimos diluyentes fueron formulados originalmente para su uso en muestra espermáticas de bovinos, su uso se ha extendido en otros rumiantes y otras especies con buenos resultados. Sin embargo, aún no hay estudios reportados donde se utilicen estos diluyentes en la preservación del semen de conejo a 5 °C. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de tres diluyentes sobre la preservación del semen de conejo a 5 °C.

## **1.2.- Planteamiento del problema:**

El diluyente que se utiliza para la preservación del semen de conejo a 5 °C o 15 °C es el TCG, el cual está elaborado a base de Tris- ácido cítrico-glucosa (Viudes-de Castro et al., 1999), sin embargo, existen numerosos estudios donde los resultados no son siempre

favorables con este diluyente, presentando variabilidad (Rosato Maria et al., 2006; Di Lorio et al., 2014).

### **1.3.- Justificación del problema:**

Actualmente, se han desarrollado diferentes protocolos y diluyentes para la preservación del semen de conejo refrigerado a 5 °C, que aseguren una alta fertilidad de por lo menos 24 horas, tiempo en el cual se podrían transportar las dosis a una distancia considerable (Hernández et al., 2004) manteniendo la viabilidad y su capacidad fecundante (Puente y Tartaglioni, 2013). Entre los más utilizados para la preservación del semen de conejo se encuentra el diluyente TCG, elaborado a base de Tris- ácido cítrico-glucosa (Viudes-de Castro et al., 1999), con el que se han obtenido resultados satisfactorios, aunque no constantes, existiendo una gran variabilidad entre resultados obtenidos por diferentes autores (Rosato Maria et al., 2006; Di Lorio et al., 2014). No obstante, existen diferentes tipos de diluyentes comerciales que se han estado utilizado con resultados favorables en la preservación del semen de diferentes especies, entre ellos se encuentran el diluyente comercial AndroMed® y OPTIXcell®, los cuales ya vienen preparados para su empleo en la preservación del semen de distintas especies, contrario con el diluyente TCG cuya preparación tiene que ser al momento.

## **II.- Objetivos e Hipótesis:**

### **2.1.- Objetivo general:**

Evaluar el efecto de tres diluyentes sobre la preservación del semen de conejo a 5°C.

### **2.1.2.- Objetivo específico:**

Analizar la motilidad, viabilidad, actividad mitocondrial e integridad del acrosoma del semen de conejo a las 0, 24, 48, 72 horas de almacenamiento a 5°C.

### **2.2.- Hipótesis:**

Los diluyentes AndroMed® y OptiXcell® preservan un 10% más la calidad del semen de conejo a 5 °C durante 72 h, respecto al diluyente TCG.

### III.- FUNDAMENTO TEÓRICO

#### 3.1.- Fisiología reproductiva:

En el macho la instauración de la regularización hormonal comienza en la pubertad (presencia de los primeros espermatozoides en el eyaculado) que suele presentarse entre los 3, 4 y 5 meses de edad, siendo apto para la reproducción entre los 5 y 6 meses de edad o bien con el 80% del peso de adultos (3.500 kg), adquiriendo la madurez sexual entre los 7 y 8 meses. (M. Dolores)

La mayor parte de los machos de conejo de estirpes de formato medio son capaces de realizar entre 10 y 12 montas en un breve lapso de tiempo (30 a 60 minutos). Al respecto, la cubrición de una coneja más de una vez puede mejorar ligeramente las posibilidades de desencadenar la ovulación. Sin embargo, si se establece como práctica cubrir una coneja más de dos veces con el mismo macho, debe tenerse presente que el macho no produce una gran cantidad de espermatozoides y que no dispone de grandes reservas seminales, por lo que un intento, claramente innecesario, de asegurar la inducción de la ovulación puede desencadenar la falta de fertilidad de ese macho en una cubrición posterior sobre otra hembra. Estos problemas se acentúan durante el verano y el otoño, en primer lugar, por una pérdida de ardor sexual debido a las altas temperaturas y, en segundo lugar, por una disminución de la producción espermática (Jiménez y Vicente, 2012).

### **3.2.- Características del semen:**

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

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

#### **3.2.1.- Características del espermatozoide:**

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

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Estos túbulos contienen una serie compleja de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos (Hafez, 2000).

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

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

### **3.3.- Evaluación seminal:**

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

### **3.3.1.- Evaluación macroscópica:**

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

### **3.3.2.- Evaluación microscópica:**

El espermiograma clásico incluye un conjunto de pruebas microscópicas desarrolladas para estimar la calidad seminal in vitro y poder correlacionarla con la fertilidad in vivo (Saffa et al., 2008; Buxadé y Sánchez, 2000). Los parámetros microscópicos son: viabilidad, movilidad, morfología, concentración y estado de la integridad del acrosoma de los espermatozoides, en razón a que existe relación de estos parámetros con la fertilidad real del animal (Barajas, 2013).

#### **3.3.2.1.- Viabilidad:**

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

El termino viabilidad o vitalidad espermática es generalmente utilizado para referirse a los espermatozoides con membrana plasmática intacta (Almela, 2014). La integridad de la membrana plasmática se muestra por la capacidad de una célula viable para excluir el

colorante, mientras que el tinte se difunde pasivamente en las células con daño en su membrana plasmática (Di Lorio, 2014).

### **3.3.2.2.- Motilidad:**

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

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

### **3.3.2.3.- Morfología:**

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

#### **3.3.2.4.- Concentración espermática:**

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

#### **3.3.2.5.- Integridad acrosomal:**

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

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se puede recurrir a la utilización de tinciones fluorescentes como la clortetraciclina (CTC), la cual se une a los iones de calcio asociados a

las proteínas de la cara interna de la membrana de la cabeza de los espermatozoides, permitiendo así la visualización de la localización de los iones de calcio y su cambio, asociados al proceso de capacitación (Ferrian, 2007).

### **3.4.- Conservación espermática:**

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

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

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

### **3.5.- Diluyentes:**

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados para la conservación del semen; sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la viabilidad de la célula espermática por un período limitado de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación), lo que aumenta la rentabilidad del número de dosis obtenidas por eyaculado. (Vaca, 2016)

Los diluyentes tienen dos funciones básicas: el mantenimiento de la fertilidad durante la crioconservación y la dilución del eyaculado para alcanzar el número apropiado de espermatozoides por dosis inseminante (Laing et al., 1990). Los diluyentes del semen deben contener: un sustrato energético (azúcar), una concentración apropiada de electrolitos para proteger a los espermios de los cambios de pH y presión osmótica (solución tampón), componentes de alto peso molecular para proteger a las células de los efectos nocivos del frío y estabilizar las membranas durante la congelación (lecitina, proteínas, lipoproteínas), un agente crioprotector (glicerol) y antibióticos (Illera, 1994; Laing et. al, 1990).

#### **3.5.1.- Componentes de los diluyentes:**

Según Fernández (2013) los componentes son:

a) Azúcares: son componentes importantes en los diluyentes ya que pueden actuar como fuente de energía para los espermatozoides durante su almacenamiento, como es el caso de la glucosa y de la fructosa, o bien como crioprotector ya que también actúa manteniendo o incrementando la presión osmótica de manera extracelular en el espermatozoide, lo que

permite mantener la integridad de la membrana espermática al almacenamiento por un largo periodo.

b) Sustancias buffer o amortiguadores: actúan dando estabilidad a la membrana, ya que mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempo.

c) Sustancias orgánicas: son las previenen el choque por enfriamiento, por ejemplo, la yema de huevo por medio de sus lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas.

#### **3.5.1.1.- Sustratos energéticos:**

En la composición de los diluyentes seminales incluyen los carbohidratos porque estos brindan energía a las células espermáticas. Los carbohidratos pueden ser preferiblemente un azúcar de metabolismo simple y que las células pueden utilizarlo como fuente de energía (Laskutoff et. al., 2010). El sustrato de energía más frecuente utilizado en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque se han usado también la galactosa, fructosa, ribosa y trehalosa pero con resultados inferiores (Galina et al., 2009; Illera, 1994). Los carbohidratos pueden ser usados solos o en combinación y pueden ser provistos en la composición del diluyente usando una solución en una cantidad suficiente para proveer a los espermatozoides con energía. La cantidad de azúcar no debe ser menor a 0,5%. Así mismo, un exceso de carbohidratos puede aumentar la osmolaridad por lo que no debe superar el 3% en la composición (Laskutoff et al., 2010).

### **3.5.1.2.- Agentes proteicos:**

Dentro de los principales agentes proteínicos empleados en los diluyentes seminales se encuentran la yema de huevo (YH) y la leche descremada. La yema de huevo (YH) se utiliza ampliamente para la dilución del semen de diferentes especies dado el alto nivel de “factores de protección espermática” que se le atribuyen. Este efecto protector sería debido a la presencia de lipoproteínas, lecitinas y glucosa; lo que permitiría el mantenimiento de la viscosidad del semen, formando un barniz protector alrededor de los espermatozoides y proveyendo de nutrientes a los mismos (Martínez et al., 2011). La yema de huevo presenta alto peso molecular y una baja densidad de la fracción lipoproteica, lo que brinda protección al espermatozoide contra el choque por frío, además reduce la pérdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos en el acrosoma durante el almacenamiento líquido del semen ovino (Córdova et al., 2008).

Así mismo, la leche de vaca es otro compuesto clásico en la preparación de diluyentes para semen y que para ser empleada debe ser descremada (leche descremada “LD”) y llevada hasta el punto de ebullición por 15 minutos con lo que se inhibe la lactenina presente en la leche y que resulta tóxica para los espermatozoides. Con el proceso de calentamiento, la leche además de contribuir con el componente proteico para el diluyente seminal, promueve el desdoblamiento de la lactosa a glucosa y galactosa, que los espermatozoides pueden utilizar como fuente energética de mayor disponibilidad (De la Vega, 2000). El éxito del uso de la leche de vaca se debe a la fracción proteica (caseína), la cual puede actuar como amortiguador contra los cambios del pH y como agente quelante contra algunos metales pesados. También protege parcialmente al espermatozoide durante la reducción de la temperatura en el almacenamiento (Córdova et al., 2008).

En las últimas décadas se ha venido empleando la lecitina de soya en remplazo de la yema de huevo y leche de vaca por permitir mejores niveles de bioseguridad. Este componente está constituido por fosfolípidos (L- $\alpha$ - fosfatidilcolina) y aparentemente no tienen efectos citotóxicos sobre los espermatozoides ni efecto negativo sobre la motilidad espermática, por lo que ha sido utilizado en la crioconservación de semen de bovinos, equinos, porcinos, humanos y particularmente ovinos (Sharafi et al., 2009; Del Valle et al., 2011).

### **3.5.1.3.- Agentes reguladores de PH:**

La adición de agentes tamponadores a los diluyentes seminales ayuda a controlar el pH del medio. Sin estas sustancias el pH disminuye por acción del metabolismo del espermatozoide formando ácido láctico que es el principal metabolito, reduciendo el pH intracelular y su metabolismo. Entre las sustancias tamponadoras simples se encuentran el citrato y el bicarbonato de sodio con una capacidad tamponadora limitada; se han empleado sustancias más complejas que pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (TES, HEPES, MOPS y TRIS) (Galina et al., 2009; Laskutoff et al., 2010)

El TRIS (Tris(hodroxi-metil)-aminometano) fue originalmente utilizado como principal componente de diluyentes para la congelación de semen bovino, entre sus características principales están: poseer una buena capacidad tampón, actividad diurética y osmótica, además de baja toxicidad en altas concentraciones. El uso de Tris en diluyentes para semen ovino fue descrito en algunas investigaciones, en éstas se comprobó que los espermatozoides de carnero toleran una concentración de Tris de hasta 400 mM y que el azúcar más adecuado como fuente de energía para este tipo de diluyentes es la glucosa (Merino, 2003; Illera, 1994).

#### **3.5.1.4.- Agentes crioprotectores:**

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro) alcanzando una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor. Los crioprotectores pueden ser penetrantes y no penetrantes. Los primeros son de bajo peso molecular, y permeables a través de la membrana celular (glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes, los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Ávila et al., 2006).

#### **3.5.2.- Tipos de Diluyentes:**

##### **3.5.2.1.- AndroMed® a base de lecitina de soya:**

AndroMed es una concentración estéril fabricada en (Minitube, Tiefenbach, Alemania), que sirve para la preparación de un diluyente a base de extractos de lecitina de soya. Mediante los cuales, los fosfolípidos vegetales extraídos de la lecitina de soya ayudan al espermatozoide actuando como sustancias protectoras de las membranas celulares frente al efecto de shock frío (Muiño y Peña, 2009).

La concentración buffer de AndroMed contiene; fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcar, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de extrema pureza y por cada 100 mL., del diluyente preparado contiene los siguientes antibióticos; 5 mg, de tilosina, 25 mg, de gentamicina, 30 mg, de espectinomicina y 15 mg, de lincomicina (Minitübe, 2000a).

Hernández et al. (2013) indican que obtuvieron una viabilidad de 51.6% en semen caprino post-descongelamiento. Sin embargo, Stewart et al. (2016) mencionan que obtuvo 44% de viabilidad mediante la inseminación artificial en venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*).

#### **3.5.2.2.- Optixcell® a base de liposomas:**

OPTIXcell es una concentración estéril fabricada en Francia por (imv, L'Aîgle), que se utiliza para la preparación de un diluyente a base de liposomas, sustituyendo las lipoproteínas al unirse a las proteínas del plasma seminal presentes en el semen, neutralizando su efecto perjudicial sobre las membranas espermáticas protegiéndolas durante el enfriamiento y la congelación (Manjunath et al., 2002)

La concentración buffer de OPTIXcell contiene; Hidratos de carbono, sales minerales, tampón, antioxidantes, glicerol, fosfolípidos, agua ultra-pura y los siguientes antibióticos; penicilina, estreptomina, lincomicina y espectinomicina (IMV-Technologies, 2014).

Stewart et al. (2016) mencionan que, después de la descongelación de semen de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) encontraron una viabilidad del 50%, siendo apto para la inseminación artificial.

### **3.5.2.3.- TCG (Tris- ácido cítrico - glucosa):**

El diluyente TCG está compuesto por 0,25 M de Tris [hydroxymetill] aminometano, 88 mM de ácido cítrico, 47 mM de D (+) glucosa y 80 mg/L de kanamicina, pH 7,1, con una presión osmótica de 300 mOsm/l (Viudes-de Castro et al., 1999).

Zhu et al. (2015) observaron que la adición de la vitamina E al diluyente TCG (Tris- ácido cítrico- glucosa) mejora la conservación espermática del semen en conejos.

Puente et al. (2011) Menciona que realizando una adición de antioxidantes al TCG, este resulta en valores más significativos que solo el diluyente.

#### IV.- DESARROLLO DEL PROYECTO

Ubicación: El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el campo experimental de Mocochoá en el kilómetro 25 de la antigua carretera Mérida–Motul, localizado a 21° 06' 18" latitud norte y 89° 27' 12" longitud oeste, con un clima tropical subhúmedo y una temperatura media anual de 26,5°C, con una precipitación total de 900 mm y 9 msnm en la época de verano.

Selección de sementales: Se utilizarán 4 conejos machos de la raza Nueva Zelanda en etapa ya reproductiva (8 meses).

##### **Obtención de muestras seminales:**

Durante un período de 6 semanas, se colectaron dos eyaculados consecutivos/animal/semana, mediante el método de vagina artificial; los cuales fueron Mezclados (pool), divididos y diluidos en tres tratamientos: T1 (AndroMed®); T2 (Optixcell®) y tratamiento testigo (TT): Tris-ácido cítrico (TCG).



*Ilustración 1 : colecta*

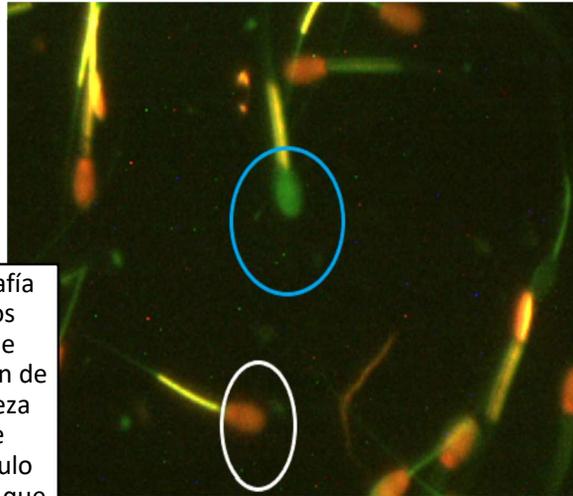
En la siguiente fotografía se aprecia la monta con ayuda de una hembra y la vagina artificial.

## Evaluación microscópica:

- A) **Viabilidad:** Se evalúa la viabilidad con mediante la fluorescencia usando de 1  $\mu$ l de IP.

*Ilustración 2: viabilidad*

En la siguiente fotografía podemos apreciar los espermatozoides que cuentan con una tinción de color verde en la cabeza son aquellos que se consideran vivos (círculo azul), mientras que los que tienen una tinción roja se considera muertos o no viables (círculo blanco).



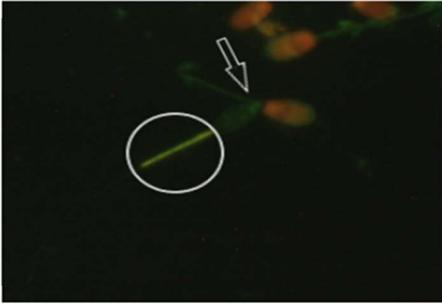
- B) **Integridad acrosomal:** Se evalúa la integridad acrosomal al realizar frotis utilizando 5  $\mu$ l de rosa de bengala y 10  $\mu$ l de semen.



La tinción marca con claridad el reborde acrosomal en presencia de acrosomas intactos (flecha roja), mientras que en ausencia de tal borde indica evidencia de un acrosoma ausente (flecha verde).

*Ilustración 3: Integridad acrosomal*

C) **Integridad mitocondrial:** Se evalúa con fluorescencia usando 2  $\mu$ l JC1.



En la siguiente foto se puede observar la comparación de una mitocondria activa (circulo blanco) y la de una inactiva (flecha blanca).

*Ilustración 4: Integridad mitocondrial*

D) **Motilidad:** Se evalúa con ayuda de la cámara Makler, software CASA y con un microscopio de contraste de fases.

**Diluyentes a utilizar:**

TCG: Tris-ácido cítrico-glucosa

Optixcell: Medio de conservación de semen bovino libre de productos de origen animal, con liposomas.

Andromed: Está compuesto de Fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectromicina, Lincomicina).

Evaluaciones: Las evaluaciones se harán a la 0, 24, 48 y 72 horas de refrigerado a 5°C.

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1.- Resultados:

En los resultados de la Tabla1, se puede observar que las 0 horas la actividad progresiva y la motilidad mitocondrial fue mayor y similar en los diluyentes Andromed y Optixcell respecto al tratamiento TCG. A las 24 horas la motilidad total, actividad progresiva, viabilidad fueron mayores y similares en los diluyentes Andromed y Optixcell respecto al tratamiento TCG, mientras que la actividad mitocondrial fue mayor en el diluyente Optixcell respecto a los diluyentes Andromed y TCG. A las 48 horas la motilidad total, actividad progresiva, actividad mitocondrial y la viabilidad fueron mayor o similares en los diluyentes Andromed y optixcell respecto al TCG. A las 72 horas la motilidad total, viabilidad, actividad mitocondrial fue mayor y similar en los diluyentes Andromed y Optixcell con respecto al diluyente TCG. El estado del acrosoma no presentó diferencia en los tres diluyentes y entre las diferentes horas.

A través del tiempo, la motilidad total (MT) decayó a partir de las 48 horas con el diluyente Andromed, mientras que en los diluyentes Optixcell y TCG se presentó a partir de las 24 horas. La motilidad progresiva (MP) decayó a partir de las 48 horas con el diluyente Optixcell en comparación con los diluyentes Andromed y TCG, los cuales descendieron a partir de las 24 horas. La actividad mitocondrial y la actividad del acrosoma fueron los únicos que se mantuvieron a través del tiempo en los tres diluyentes.

Tabla 1: Porcentaje (%) de los parámetros espermaáticos evaluados a las 0 hr y a las 6 (media ± error estándar)

Hora	Tratamiento	Motilidad Total %	Motilidad Progresiva %	Viabilidad %	Actividad Mitocondrial %	Integridad del Acrosoma %
0	T1	67 ± 29.9 <sup>A</sup>	3.8 ± 1.6 <sup>aA</sup>	71.6 ± 32	73 ± 32.6 <sup>a</sup>	92.8 ± 41.5 <sup>a</sup>
	T2	69 ± 30.8 <sup>A</sup>	3.6 ± 1.6 <sup>aA</sup>	77.2 ± 34.5	80.4 ± 35.9 <sup>a</sup>	85.8 ± 38.3 <sup>a</sup>
	TT	37.5 ± 18.7 <sup>b</sup>	2.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	63 ± 28.1 <sup>A</sup>	47.4 ± 21.1 <sup>b</sup>	90.8 ± 40.6 <sup>a</sup>
24	T1	47 ± 21 <sup>aA</sup>	2.8 ± 1.2 <sup>aB</sup>	57.6 ± 23.5 <sup>a</sup>	64.5 ± 26.3 <sup>b</sup>	79.3 ± 32.3 <sup>a</sup>
	T2	49 ± 21.9 <sup>ab</sup>	3.2 ± 1.4 <sup>abA</sup>	66.6 ± 27.2 <sup>a</sup>	78.3 ± 31.9 <sup>a</sup>	82.3 ± 33.6 <sup>a</sup>
	TT	16 ± 7.1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	36.6 ± 14.9 <sup>bB</sup>	54.1 ± 22.1 <sup>b</sup>	76.33 ± 31.16 <sup>a</sup>
48	T1	40 ± 16.3 <sup>ab</sup>	2.6 ± 1.0 <sup>abC</sup>	62 ± 25.3 <sup>a</sup>	68.3 ± 27.8 <sup>a</sup>	84.50 ± 32.3 <sup>ab</sup>
	T2	43.3 ± 17.6 <sup>ab</sup>	2.5 ± 1.0 <sup>abC</sup>	67 ± 27.3 <sup>a</sup>	76 ± 31.0 <sup>a</sup>	77.33 ± 33.6 <sup>b</sup>
	TT	11 ± 4.9 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	26.1 ± 10.6 <sup>bB</sup>	38.3 ± 15.6 <sup>b</sup>	87.33 ± 31.1 <sup>a</sup>
72	T1	23.7 ± 11.8 <sup>abB</sup>	1.7 ± 0.8 <sup>C</sup>	59.3 ± 24.2 <sup>a</sup>	70.3 ± 28.7 <sup>a</sup>	83.6 ± 34.1 <sup>a</sup>
	T2	30 ± 12.2 <sup>ab</sup>	2.1 ± 0.8 <sup>C</sup>	70.1 ± 28.6 <sup>a</sup>	72.8 ± 29.7 <sup>a</sup>	81.1 ± 33.1 <sup>a</sup>
	TT	14 ± 6.2 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	35 ± 14.2 <sup>bB</sup>	42.6 ± 17.4 <sup>b</sup>	81.5 ± 33.2 <sup>a</sup>

T1: Andromed; T2: Optixcell; TT: Testigo (TCG). (a, b) Literales diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada hora ( $P > 0.05$ ). (A, B, C) Literales diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el mismo tratamiento a través del tiempo.

## 5.2.- Discusión:

Durante el proceso de refrigeración, los espermatozoides se someten a temperaturas que van desde los 5 °C a los 15 °C, permitiendo que su metabolismo se ralentice y prolongue su vida fértil. Asimismo, puede provocar alteraciones en la membrana de los espermatozoides que puedan repercutir en su poder fecundante. Para contrarrestar estos daños perjudiciales ocasionados por el choque de frío, se ha recurrido a la incorporación de nuevos aditivos, como los fosfolípidos vegetales y los liposomas a los diluyentes de semen, que puedan proporcionar una mayor supervivencia y funcionalidad de las membranas espermáticas (Budai et al., 2014; Maxwell and Stojanov, 1996).

Diferentes estudios demuestran que el diluyente TCG mantiene en mejores condiciones las cualidades del semen de conejo en refrigeración a 15 °C durante 72 horas (Rosato et al., 2006) y 96 horas (Roca et al., 2000), mientras que otros estudios reportan lo contrario en muestras espermáticas de conejo almacenadas a 5 °C durante 48 horas (Fadl et al., 2003) y a las 72 horas (Di Iorio et al., 2014). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, en el cual las muestras diluidas y almacenadas a 5 °C con el diluyente TCG presentaron menor calidad, respecto a los diluyentes Andromed y Optixcell. Esto podría deberse a los diluyentes comerciales utilizados en este estudio los cuales contienen fosfolípidos vegetales y liposomas, que contrarrestan los daños perjudiciales ocasionados por el choque de frío, tal como se ha observado en muestras espermáticas de ovino (Sandoval M, et. al, 2007), caprino, (Marvulle, 2019), perros (Cordoso cohelo, et al., 2018), Búfalo (M.S. Ansari et al., 2016), venados (Stewart et al., 2016), entre otros. Asimismo, esta mejoría también podría ser debido a que los diluyentes empleados en el estudio contienen glicerol, el cual también ayuda a contrarrestar los daños perjudiciales ocasionados por el choque de

frío. No obstante, se ha reportado que el DMSO es el que mejor capacidad crioprotectora presenta en muestras espermáticas de conejo, respecto al triladyl. Sin embargo, cuando se utiliza para almacenar el semen de conejo a 5 °C o 15 °C, la calidad espermática decae a partir de las 6 horas. Esto es debido a que el DMSO tiene un efecto tóxico en las células espermáticas de conejo, el cual afecta la motilidad, la desestabilización de la membrana y la desnaturalización de proteínas y enzimas (Rosato y Iaffaldano, 2013; Swain y Smith, 2010). Al parecer, los espermatozoides de conejo son más tolerantes al glicerol en la refrigeración, mientras que en la congelación el DMSO es el que mejor efecto crioprotector confiere debido a su mayor permeabilidad (Fox y Burdick, 1963; Sawada y Chang, 1964).

### **5.3.- Conclusión:**

Los diluyentes comerciales Andromed y Optixcell son los que mejor preservan el semen de conejo a 5°C durante 72 h, en comparación con el diluyente TCG.

## VI.- BIBLIOGRAFIA

- Aisen G. 2004. Producción ovina y caprina. Ed Intermédica. Buenos Aires. Argentina.
- Almela V.L. 2014. Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos de la raza bovina Murciano Levantina: recogelación de espermatozoides. Tesis de Doctorado. Murcia
- Almela V.L. 2014. Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos de la raza bovina Murciano Levantina: recogelación de espermatozoides. Tesis de Doctorado. Murcia.
- Alvariño M.R. 2000. Control de la Reproducción en el Conejo. Ed Mundi Prensa. México.
- Ambriz G.D; Contreras M.J; Hernández P.O; Mercado P.E; Cervantes R.F y Rosado G.A. 2003. Acta Zoológica de México 88:257-269.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S., & Ashiq, M. (2016). OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*, 85(3), 528–532. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.035
- Armas R. S. 2009. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos post orquiectomía. Tesis de Doctorado. Lima.
- Barajas P.D. 2013. Expresión proteomica del plasma seminal del toro criollo San Martinero y su relación con la fertilidad y desarrollo embrionario in vitro en condiciones del trópico bajo colombiano. Tesis de Doctorado. Murcia.
- Bonet et al., (2009.) Elaboración y conservación de dosis seminales. (Consultado el 5 de julio del 2016). [Disponible en]:

file:///C:/Documents%20and%20Settings/ADC/Escritorio/conejos/15\_11\_21\_4. pdf.

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

Budai Csilla, Egerszegi Istvan, Olah Janos, Javor Andras, Kovacs Andras. 2014. The Protective Effect of Antioxidants on Liquid and Frozen Stored Ram Semen. *Animal Science and Biotechnologies*. 46 -52.

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

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

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

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

Fao el salvador. 2018. <https://www.fao.org/contact-us/es/>.

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

- Fox, R.R.; Burdick, J.F. (1963). Preservation of rabbit spermatozoa: ethylene glycol vs. glycerol for frozen semen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113: 853–856.
- Hafez B y Hafez S.E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed McGraww Hill Interamericana. México.
- Hernández E.J; Fernández F.R; Avalos A.R; Díaz R.B y Olvera F.A. 2004: Efecto de la adición de gelatina a semen de conejo almacenado a 12°C. *Revista Salud Animal* 26(3): 197-201.
- Inaba K. 2011. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction*. 17(8): 524–538.
- Jiménez M y Vicente A. 2012. Biotecnología de la reproducción en especies ganaderas. Ed Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- Jiménez, E., Pérez-Marín, C., Vizuite, G., Millán, Y., & Agüera, E. (2013). Effect of Different Extenders on In Vitro Characteristics of Feline Epididymal Sperm During Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(4), 665–672. doi:10.1111/rda.12142
- López-Brea G.J. 1992. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis de Doctorado. Madrid.
- Ma, Dolores. Fisiología de la reproducción en conejos domésticos. Facultad de veterinaria en Cáceres. [Disponible en]: file:///C:/Users/ACER/Desktop/Articulos%20conejos/Dialnet-FisiologiaDeLaReproduccionEnElConejoDomestico-2869174.pdf.

Mata Monserrat. 2018. Edomex, productor líder en carne de conejo. Periódico Milenio. <https://www.milenio.com/negocios/edomex-productor-lider-en-carne-de-conejo>.

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

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

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

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

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

Roca J., Martínez S., Vázquez JM., Lucas X., Parrila I., and Martínez EA. 2000. “Viability and Fertility of Rabbit Spermatozoa Diluted in Tris-Buffer Extenders and Stored at 15°C.” *Animal Reproduction Science* 64(1–2):103–12.

Rosato, M.P.; Iaffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin

plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79: 508–516.

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

SADER Aguascalientes. 2013.

<https://www.gob.mx/agricultura%7Caguascalientes/es/articulos/fomento-para-la-produccion-de-conejo-a-nivel-nacional>.

Sawada, Y.; Chang, M.C. (1964). Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril.*, 15: 222–229.

Suarez C, Sierra A, Restrepo D, Duque E, Restrepo G. 2020. Evaluación de diluyentes para la refrigeración de semen de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista de investigaciones veterinarias peruanas*. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17857>.

Swain, J.E.; Smith, G.D. (2010). Cryoprotectants, en: *Fertility Cryopreservation*. Ed. Cambridge University Press. UK: 24–38.

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

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

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

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

Zhu, Z., Fan, X., Lv, Y., Zhang, N., Fan, C., Zhang, P., & Zeng, W. (2015). Vitamin E Analogue Improves Rabbit Sperm Quality during the Process of Cryopreservation through Its Antioxidative Action. PLOS ONE, 10(12), e0145383. doi: 10.1371/journal.pone.0145383

W.M.C. Maxwell; P.F. Watson (1996). Recent progress in the preservation of ram semen., 42(1-4), 0–65. doi:10.1016/0378-4320(96)01544-8