

GENÉTICA

Preservación seminal: estado actual en la especie cunícola

El presente artículo tiene como objetivo la revisión del estado actual de los procesos de preservación de semen de conejo tanto a nivel de campo como de investigación, abarcando desde el proceso de extracción hasta la conservación de semen en diferentes condiciones (semen fresco, refrigerado, congelado y liofilizado).

PAULA DOMINGO TOMÁS Y LYDIA GIL HUERTA*

L

a inseminación artificial (IA) es una práctica común en las explotaciones cunícolas españolas, la cual se instauró a finales de los años 80 para la producción de carne de conejo (López y Alvariño, 2000; Lavara *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2012). Este gran salto se produjo gracias a que la fertilidad obtenida mediante IA, a partir tanto de semen fresco como de semen refrigerado, se asimilaba a la obtenida mediante monta natural (80%) (Hernández *et al.*, 2012).

La IA aportó notables ventajas tales como la disminución del número de machos en la granja debido a la capacidad de un macho de cubrir entre 30 y 35 hembras por eyaculado, la valoración de la calidad del semen y el control de enfermedades, la reagrupación de las hembras en el mismo estadio del ciclo y sincronización de partos, la creación de centros de testaje, la distribución de semen, la selección de machos y la mejora genética de la raza, lo que conlleva a un aumento

en la eficiencia económica (Alvariño, 1993; López y Alvariño, 1998).

Una vez obtenido un eyaculado, su procesamiento puede variar en función de su aplicación. A nivel de granja se puede utilizar tanto semen fresco como semen refrigerado, mientras que a nivel experimental se están investigando otros métodos como la congelación y la liofilización.

Antes de procesar el semen para preservarlo deben seguirse unos pasos comunes a todas

*Departamento de Reproducción Animal, Universidad de Zaragoza, España

TABLA 1. Principales parámetros de semen puro de conejo.

Parámetros	Primer eyaculado	Segundo eyaculado
Volumen en ml (sin gel) ²	0,86 ± 0,05	0,55 ± 0,05
Densidad ¹	Denso, cremoso	Menos denso
Color ¹	Blanco nacarado	Más claro
pH ²	7,49 ± 0,05	7,37 ± 0,07
Espermatozoides por ml (millones) ²	421 ± 43,5	736 ± 43,5
Motilidad de espermatozoides (%) ²	60,0 ± 2,8	77,8 ± 2,8

¹ Alvaríño, 2000; ² Fallas-López et al., 2011

las técnicas. Primero debe recuperarse el semen mediante una vagina artificial y un tubo colector (**Foto 1**). La temperatura del agua que se encuentra entre la camisa y el cuerpo de la vagina debe estar en torno a los 50-55°C (Lavara et al., 2003; Carluccio et al., 2004) con el fin de que la camisa de la vagina artificial alcance, al menos, los 42°C en el momento de la recogida, asemejándose así a la temperatura de la vagina de la coneja. Si la temperatura es inferior a 42°C el macho tendrá dificultad para saltar mientras que si la temperatura es superior a los 50°C corremos el riesgo de que el macho se orine e incluso podría ocasionarle lesiones en el pene (Alvaríño, 1993).

El ritmo de recuperación idóneo sería de 2 ó 3 veces por semana y macho, distanciadas en el tiempo al menos 30 minutos cuando se realice en el mismo día (El-Tarabany et al., 2015). Como se observa en la **Tabla 1**, el volumen de los eyaculados oscila entre 0,3 y 1 ml y la concentración va de 150 a 700 x10⁶ espermatozoides por ml, siendo susceptibles a variaciones (Rosell, 2000).

Recuperado el eyaculado, deberemos retirar la fase gelatinosa o tapón mucoso en aquellos eyaculados donde

esté presente evitando de este modo que se aglutinen los espermatozoides y pierdan la movilidad (Fallas-López et al., 2011). Posteriormente se realiza una valoración macroscópica (volumen, densidad, color, pH) del semen y una primera valoración microscópica (motilidad, porcentaje de espermatozoides móviles, trayectorias rectilíneas del espermatozoide, espermatozoides anómalos y presencia de aglutinaciones, cuerpos extraños o células descamativas) de cada eyaculado para poder desestimar los de peor calidad (Alvaríño, 1993; Lavara et al., 2003; Carluccio et al., 2004) (**Tabla 1**). Una vez valorado, se diluye en proporción 1:5 antes de 10 minutos postrecogida, siendo la temperatura del diluyente alrededor de 37°C para evitar que se produzca un shock térmico (Lavara et al., 2003). Finalmente los eyaculados de buena calidad son mezclados para obtener una mezcla heterospermica (pool) (Carluccio et al., 2004). En líneas de investigación no siempre se hacen muestras heterospermicas, pues hay ocasiones en las que es interesante tener constancia de a qué macho pertenece el eyaculado. La dilución favorece la supervivencia de los espermatozoides y permite

A nivel de granja se puede utilizar tanto semen fresco como semen refrigerado, mientras que a nivel experimental se están investigando otros métodos como la congelación y la liofilización

aumentar el volumen total de masa espermática de este modo a partir de un solo eyaculado se inseminan un elevado número de hembras (Alvaríño, 2000; Lavara et al., 2003).

El color varía cuando existe una patología, puede ser de color amarillo (orina en el eyaculado), rojizo (sangre fresca), marrón (elementos sanguíneos degenerados), blanquecino-transparente (baja concentración espermática) o muy opaco (degeneraciones testiculares) (Alvaríño, 1993).

Por último, es necesario hacer un recuento de espermatozoides/ml con cámaras de recuento celular (cámara de Neubauer, Bürker, Thoma) con el fin de diluir la muestra hasta

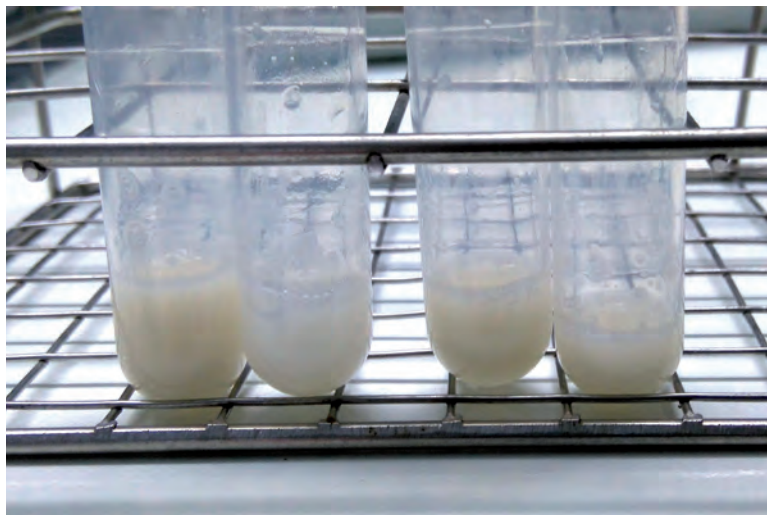


Foto 1.
Colectores con semen recién extraído

ajustar la concentración de espermatozoides deseada. Cada dosis deberá tener una concentración de 10 a 20 millones de espermatozoides (Lavara *et al.*, 2003) para cubrir las exigencias mínimas para la fecundación (entre 1-6 millones de espermatozoides móviles por dosis) (Alvariño, 1993). En el caso de inseminar a partir de monodosis es necesario dispensar el pool en cánulas (puede realizarse manualmente o con envasadora automática) (**Foto 2**).

Hay diferentes tipos de cánulas y de diferentes materiales (**Foto 3**). Las primeras cánulas que se utilizaron para la IA en conejos con semen fresco o refrigerado eran de vidrio pero presentaban riesgo de rotura o perforación del genital de la coneja en el momento de la aplicación, por ello se empezaron a buscar alternativas como las cánulas de plástico. Hay cánulas de plástico rígido y de plástico flexible de un solo uso. Las de plástico rígido (puede ser acodada o no) están preparadas para ser aplicadas por una pistola de inseminación y las dosis están preparadas en pool. Por otro lado,

las cánulas de plástico flexible ya vienen cargadas de semen (monodosis). Algunos autores recomiendan que las cánulas deben impregnarse de vaselina para facilitar su aplicación (Mora, 2014).

Debemos tener en cuenta que para tener éxito con la IA previamente hay que inducir la ovulación a la coneja, ya que la coneja no presenta un ciclo estral regular sino que la ovulación es inducida por el macho si la coneja está receptiva. Puede favorecerse la receptividad o el estro de la coneja mediante un tratamiento con una hormona folículo estimulante como la PMSG (eCG), 20-25 UI a las 48-72 horas antes de la IA (Theau-Clément, 2007), provocando así la maduración de una nueva oleada folicular, un aumento de los estrógenos y el comportamiento de celo (vulva roja). También puede favorecerse la salida del estro con bioestímulos (Flushing alimenticio y luminoso, lactancia controlada). Finalmente, para reforzar la respuesta ovulatoria, se administra GnRH o un análogo en el mismo momento de la IA (Alvariño, 1993; Rosell, 2000).



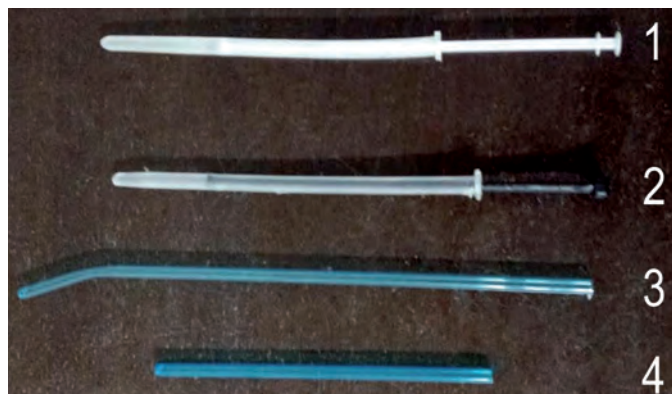
Foto 2.
Envasadora automática de semen en cánulas monodosis

Semen fresco

El semen fresco no presenta ningún tratamiento térmico, los espermatozoides se mantienen a temperatura ambiente, y es aconsejable realizar la IA en las 4 primeras horas tras su obtención (Rosato *et al.*, 2006). El protocolo descrito anteriormente es el que hay que seguir para preparar dosis a partir de semen fresco, pudiéndose emplear diluyentes específicos para refrigerar semen o diluyentes iónicos como el suero fisiológico o la solución salina tamponada de fosfato (Alvariño, 1993; Lavara *et al.*, 2003).

Semen refrigerado

La supervivencia de los espermatozoides se ve afectada tanto por la temperatura de almacenamiento como por la composición del diluyente (Carluccio *et al.*, 2004). De este modo, cuando el semen se mantiene a temperaturas de refrigeración entre 16 y 18°C debe utilizarse entre las 36 y 48 horas tras su recuperación, para evitar que la fertilidad disminuya considerablemente (López y Alvariño, 1998).

**Foto 3.**

Cánulas monodosis, cánulas rígidas y pistola utilizada en la IA en conejos. *1 y 2 cánula flexible, 3 cánula rígida acodada, 4 cánula rígida recta.

En granjas de cría intensiva sería útil poder almacenar semen por períodos superiores a 48 horas, por ello actualmente se está investigando la formulación de diluyentes con nuevos componentes que permitan largos períodos de almacenamiento de semen y la optimización del proceso de refrigeración (Carluccio *et al.*, 2004).

Los diluyentes deben presentar la siguientes características: presión osmótica isotónica (para no perder la motilidad ni

que aparezcan formas anómalas), sustancias tampón para mantener el pH en torno a 7, sustancias coloidales para proteger los espermatozoides, sustancias nutritivas que favorezcan el metabolismo, vida y longevidad del espermatozoide y estar libres de bacterias u organismos infecciosos (Alvario, 1993).

La mayoría de los diluyentes están compuestos a base de una solución tampón y suplementos que ayudan a mantener los espermatozoides. La so-

lución tampón está compuesta por citrato de sodio, acetato potásico y/o bicarbonato sódico que son los encargados de aportar los minerales necesarios para garantizar un pH y equilibrio iónico adecuado. Los suplementos más utilizados son el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) (anticoagulante, evita la aglutinación y precipitación de los espermatozoides), glucosa (suplemento energético), antioxidantes (disminuyen el estrés oxidativo) y bactericidas (antibióticos como

RHDV + RHDVb detection kit

CerTest
BIOTEC

Test Rápido para la detección del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) a partir de muestras de tejido (hígado) o de exudado de la cavidad abdominal del conejo.



Una herramienta sencilla, rápida y precisa que facilita al **profesional veterinario** la identificación de la “clásica” y la “nueva variante” del virus

CERTEST BIOTEC, S.L. • Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (ESPAÑA) • www.certest.es

la gentamicina, penicilina, enrofloxacina y/o estreptomina que evitan la proliferación de bacterias).

Los diluyentes sin hormona análoga a la GnRH que actualmente están en el mercado son Lepus® (MEDI Chimica, Reggio Emilia, Italia), M III® (MINITUB, Tiefenbach, Alemania), Galap® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia), Cunigel® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia), IA-873A® (INSERBO, Lleida, España). Por otro lado, el diluyente MRA-BIT® (KUBUS S.A., Madrid, España; compuesto por dextrosa, citrato sódico, acetato potásico y excipiente) evita tener que administrar de forma intramuscular la hormona GnRH o un análogo de la misma en el momento de la IA gracias a su composición.

López y Alvario en 1998, estudiaron la conservación de semen de conejo con diluyente MA24® (Laboratorios Ovejero, León, España) a 18°C durante 96 horas. En este estudio podemos observar que la fertilidad se mantiene en el 80% cuando el semen se aplica entre las 2 y las 48 horas tras su extracción. Tras pasar 48-72 horas la fertilidad desciende al 68% y cuando la IA se ha realizado después de 96 horas, la fertilidad no supera el 40%.

Semen congelado

En el proceso de congelación-descongelación se forman cristales de hielo intracelulares en los espermatozoides causando destrucción celular y daño de sus membranas entre ellas el acrosoma (Fuller y Painter, 2004; Hernández *et al.*, 2012), lo que conlleva una bajada de la tasa de fertilidad de, al menos, un 20% (Castellini *et al.*, 2006).

Mientras que el semen conge-

La liofilización se utiliza para preservar virus, bacterias, levaduras, hongos y actualmente también es utilizada para preservar espermatozoides, con el fin de facilitar el almacenamiento y el transporte

lado se ha empleado con éxito en la IA de otras especies como en el vacuno (Carluccio *et al.*, 2004), en la especie cunícola no se ha desarrollado ni un procedimiento ni se ha identificado un agente crioprotector (CPA) efectivo, por lo que en cunicultura no suele usarse a nivel comercial (López y Alvario, 1998; Maeda *et al.*, 2012).

Los diluyentes compuestos a base de Tris (Tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico y fructosa o glucosa) son los utilizados frecuentemente para criopreservar el semen de conejo (Mocé y Vicente, 2009). Es frecuente encontrar yema de huevo en concentraciones de 10 y 20% en el compuesto de Tris (Fox, 1961) o leche desnatada con una concentración final entre el 8 y 10% (O'Shea y Wales, 1969). Mientras que en otros mamíferos el glicerol es el CPA de elección, en conejos no es el más adecuado (Iaffaldano *et al.*, 2012). Suelen utilizarse CPAs de menor peso molecular y mayor permeabilidad como amidas o grupos metilos (dimetilsulfóxido (DMSO), lactamida o acetamida) (Curry *et al.*, 1995; Mocé y Vicente, 2009).

En 1971 se desarrolló un diluyente por Stranzinger *et al.* que estaba formado por yema de huevo, glucosa, ácido cítrico, Tris, DMSO, glicerol, penicilina y estreptomina. Actualmente hay un diluyente comercial de congelación, CUNIFreeze® (IMV Technologies) que contiene 20,3% de yema de huevo y un CPA no especificado (Mocé y Vicente, 2009). Sin embargo, ni estos diluyentes ni los descritos en la bibliografía han demostrado ser suficientemente eficaces para la congelación de semen de conejo (Iaffaldano *et al.*, 2012).

Para congelar semen, el protocolo habitual consiste en la obtención del eyaculado y dilución entre 1:5 y 1:10 con diluyentes específicos para la criopreservación, seguidamente se procede al descenso gradual de la temperatura para evitar un shock térmico. Generalmente se desciende la temperatura hasta los 5°C en un período de 90 a 120 min (Mocé y Vicente, 2009). A continuación se almacena el semen diluido y refrigerado en pajuelas de plástico de 0,5 cc. (Alvario, 1993). Posteriormente, antes de ser sumergido en nitrógeno líquido para su almacenamiento, se congela el semen colocándolo durante 6-10 minutos entre 2 y 10 centímetros por encima del nivel de nitrógeno líquido (Alvario, 1993; Mocé y Vicente, 2009). Para realizar la descongelación, se coloca la pajuela durante 1 minuto en "baño maría" a 25°C ó 21 segundos a 37°C, según cada autor (Mocé y Vicente, 2009).

De todos modos, la utilización de semen congelado estaría limitada por un coste mayor (mayor tiempo y necesidad de equipamiento específico) que difícilmente será asumible y además una disminución de la fertilidad. No obstante, podría

utilizarse para la introducción de material genético para la producción de abuelas o hembras cruzadas.

Semen liofilizado

La liofilización se utiliza para preservar virus, bacterias, levaduras, hongos y actualmente también es utilizada para preservar espermatozoides de mamíferos, con el fin de facilitar el almacenamiento y el transporte (Day y Stacey, 2007).

Los espermatozoides, una vez se han liofilizado, son inmóviles e incapaces de fecundar, pero sí que son capaces de producir descendencia en vivo

cuando se realiza por ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides en ovocitos) (Kaneko *et al.*, 2003) y aun así la tasa fertilidad se ve seriamente comprometida. Por lo que su uso es exclusivamente experimental, ya que el conejo es utilizado como modelo para el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la biotecnología de la reproducción en humanos.

Para llevar a cabo el proceso de liofilización primero debe congelarse el semen. A continuación las muestras se someten al proceso de liofilización: se realiza un secado primario a una presión de 0,053 mbar a -68°C , un secado secundario

a una presión de 0,018 mbar a 20°C y finalmente se almacena (Gil *et al.*, 2014; Olaciregui *et al.*, 2015).

El único estudio publicado sobre la posibilidad de obtener descendencia a partir de espermatozoides liofilizados es de Liu *et al.* en 2004. En esta experiencia se transfirieron 230 embriones obtenidos mediante ICSI a 8 conejas de las cuales una quedó gestante y parió a los 33 días un feto formado y normal pero muerto a causa de una distocia a la hora del parto. ♦

BIBLIOGRAFÍA

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: redaccion@editorialagricola.com

PLANETA GANADERÍA

SPACE

13-16 SEPT. 2016
Rennes - Francia

SPACE: el Salón con una oferta completa en todos los sectores: bovino (leche-carne), porcino, avícola, ovino y cunícola.

Más de **1.400** expositores repartidos en 11 pabellones, y al aire libre.

Se esperan más de **106.000** visitantes profesionales, entre ellos,

más de **15.000** internacionales.

Se presentan más de **700** animales.

Una superficie neta de exposición superior a **156.000** m².

Más de **370** periodistas, entre ellos, 87 internacionales.

EL SALÓN INTERNACIONAL DE LAS PRODUCCIONES ANIMALES

www.space.fr

Tel. +33 223 48 28 80
international@space.fr

