

CONGELACION DE SEMEN DE CONEJO. VALORACION DE UN MEDIO DE CONGELACION SIN YEMA DE HUEVO Y ELEVADA CONCENTRACION DE DMSO. PRIMEROS RESULTADOS

M.P. Viudes De Castro, J.S. Vicente, F.J. García-Diego
Laboratorio de Reproducción
Departamento de Ciencia Animal
Universidad Politécnica de Valencia
46071-Valencia

INTRODUCCION

Los resultados obtenidos mediante inseminación artificial con semen fresco sitúan el porcentaje de hembras gestantes entre un 60 y un 80%, con una prolificidad similar a la obtenida por monta natural (7-10 gazapos vivos por parto, Castellini *et al*, 1990; Rebollar *et al*, 1992; Bourdillon *et al*, 1992; Szendro *et al*, 1992). Sin embargo, la inseminación en cunicultura se encuentra limitada por el tiempo de refrigeración recomendado para el semen (36 horas a 5°C) y por los bajos resultados en la congelación de semen (fertilidad: 40-50%, prolificidad inferior en 2 gazapos, Theau-Clement y Roustan, 1980; Martin, 1993).

La mejora de los resultados actuales de inseminación con semen congelado podría permitir tanto la introducción de material de alto valor genético en una explotación, salvando inconvenientes patológicos y de adaptación, como inseminar hembras genéticamente valiosas localizadas en distintas granjas y en diferente momento para recuperar, conservar y agrupar sus embriones.

En general, los medios de congelación de semen de conejo incluyen además de la yema de huevo, un crioprotector como el dimetilsulfóxido (DMSO) o la acetamida. El DMSO a concentraciones entre un 6% y un 9% permite obtener post-descongelación una proporción de espermatozoides móviles del 40% al 50% y un porcentaje variable de espermatozoides con el acrosoma intacto (16% a 70% Castellini *et al.*, 1992 ; Martin, 1993). La utilización de acetamida (0.5 M a 1 M) en el medio de congelación proporciona post-descongelación de un 40% a un 60% de motilidad y en torno a un 60% de normalidad acrosómica; Hanada y Nagase, 1980; Chen y Foote, 1994; Martin, 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos en fertilidad y prolificidad no son comparables a los obtenidos en la inseminación con semen fresco.

El objetivo de estos estudios preliminares es obtener un medio de congelación de semen que asegure un elevado porcentaje de hembras gestantes o susceptibles de ser donantes de embriones.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizan machos y hembras de origen Neozelandés. Los resultados que se presentan corresponden actualmente a las inseminaciones realizadas sobre hembras nulíparas y primíparas. En estudios previos se evaluaron diferentes medios de congelación constituidos por un tampón Tris-cítrico, DMSO, yema de huevo y diferentes azúcares (Gómez, 1994), siendo el mejor valorado el utilizado en esta experiencia (sin yema de huevo, con un 12% de DMSO y 0.05M de sacarosa).

Se controlan tres grupos de animales, un primer lote constituido por hembras que son montadas, un segundo lote en el que las hembras son inseminadas con semen fresco, y un

tercer lote en el que las hembras son inseminadas con semen congelado.

Inmediatamente después de la recogida del semen, se procede a la valoración de los eyaculados: aspecto, volumen, motilidad individual (medida por dos observadores sobre dos réplicas por contraste de fases a 400 aumentos) y, tras la fijación con glutaraldehído, concentración (Cámara Thoma), normalidad acrosómica, gotas citoplasmáticas y formas anormales (contraste interferencial a 1200 aumentos y microscopía electrónica de barrido).

Las hembras inseminadas, tanto con semen fresco como con semen congelado, reciben 20-30 millones de espermatozoides progresivos y son inducidas a ovular inmediatamente después con una inyección intramuscular de 0.2 ml de Gonadorelin (Fertagyl).

El número de nacidos vivos y totales han sido analizados en el programa GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla 1 muestra los valores medios de: volumen; motilidad y concentración, así como los porcentajes de normalidad acrosómica, gotas citoplasmáticas, formas anormales y motilidad y normalidad acrosómica post-descongelación de los eyaculados recuperados hasta el momento. A diferencia de algunos autores que seleccionan los eyaculados por su motilidad inicial (mayor del 80%, Martín, 1993; Chen y Foote, 1994), en esta experiencia tan sólo se han desestimado aquellos eyaculados oligospermicos o con un elevado porcentaje de formas anormales e inmaduras (mayor del 15%). La menor motilidad progresiva valorada en un eyaculado fue de un 62%.

Tabla 1. Valoración de los eyaculados.

	Vol.	Mot.	Conc.	N.A.	Gotas	Anor.	Mot.P	N.A.P
n	41	41	41	41	41	41	27	27
m	0.75	78	282	88	6.5	1.7	53	64
e.s.	0.04	2	23	1	0.7	0.3	1	2

n: nº de eyaculados valorados. m: media. e.s.: error estándar. Vol: volumen. Mot.: porcentaje de motilidad progresiva. Conc.: millones de espermatozoides por mililitro. N.A.: porcentaje de normalidad acrosómica. Gotas: porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática. Anor.: porcentaje de espermatozoides anormales. Mot.P: porcentaje de motilidad progresiva post-descongelación. N.A.P: porcentaje de normalidad acrosómica post-descongelación.

Como puede observarse en la tabla 1, los porcentajes de motilidad post-descongelación y normalidad acrosómica alcanzan en promedio el 53% y el 64% respectivamente. Sólo la motilidad progresiva es concordante con los resultados obtenidos por otros autores para elevados niveles de DMSO. No obstante, la normalidad acrosómica es superior y comparable a la obtenida con acetamida. La inclusión de la sacarosa y algunas modificaciones introducidas en el método de congelación (que aún están siendo estudiadas) han permitido esta mejora.

La tabla 2 muestra los resultados de fertilidad y prolificidad de las primeras inseminaciones realizadas. En estos primeros resultados no se observan diferencias entre los grupos. No obstante, aunque al final de la experiencia la prolificidad obtenida fuese de uno o dos gazapos menos, si el porcentaje de hembras gestantes (fertilidad) se mantuviera en torno al 80% facilitaría la consecución de nuestros objetivos: la difusión y la recuperación de material genético de alto valor. Los resultados obtenidos hasta el momento, en una experiencia

paralela de recuperación de mórulas para vitrificación tampoco muestran diferencias significativas en cuanto al número y calidad morfológica de las embriones recuperados (6.6 mórulas normales por hembra nulípara).

Tabla 2. Resultados de fertilidad y prolificidad.

Lote	n	Gestaciones (%)	Nacidos Vivos m ± e.s.	Nacidos Totales m ± e.s.
Inseminación Fresco	22	19 (86)	7.4 0.7	7.6 0.8
Inseminación Congelado	23	18 (78)	7.0 0.7	7.4 0.7
Monta	54	41 (76)	7.5 0.5	8.1 0.5

n: nº de inseminaciones o montas. m ± e.s. : media ± error estándar.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo esta subvencionado por el proyecto de la CICYT nº AGF 94-0577

BIBLIOGRAFIA

- Bourdillon, A.; Chmitelin, F.; Jarrin, D.; Perez, V.; Roullere, H.; (1992). V World Rabbit Congress. Vol A, 530-537.
- Castellini, C.; Facchin, E.; Cancellotti, M.; (1990). 5èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris. Comunicación 5.
- Castellini, C., Battaglini, M., Lattaioli, P. (1992). V World Rabbit Congress, Vol. A. 431-438.
- Chen, Y.; Foote, R. H. ; (1994). Animal Reproduction Science, 35: 131-143.
- Gómez J., (1994). Proyecto fin de carrera, E.U.I.T.A., Universidad Politécnica de Valencia.
- Hanada, H.; Nagase, H.; (1980). Journal Reproduction and Fertility, 60: 247-252.
- Martin, M., (1993). Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Rebollar, P.G.; Ubilla, E.; Rodríguez, J. M.; (1992). V World Rabbit Congress. Vol. A, 407-411
- SAS, (1989). Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc.
- Szendro, Z. S.; Biro, E.; Nemet, H.; Ralnai, I. , (1992). V World Rabbit Congress. Vol. A, 333-347.
- Theau-Clement, M.; Roustan, A.; (1980) . II World Rabbit Congress.