

Primeros resultados de inseminación artificial en conejas de monte en cautividad.

Dávila M.; Badía S.* y Rebollar P.G.

Dpto. de Producción Animal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Universidad Politécnica de Madrid.

*Granja Cinegética Cunicinca S.L., Fraga (Huesca)

Resumen

En España existen granjas cinegéticas para la producción de conejos de monte con el objetivo de la repoblación en cotos de caza y de esta forma intentar preservar la diversidad del ecosistema mediterráneo. Para aplicar la inseminación artificial en estas granjas, primero es conveniente conocer los parámetros seminales de estos animales criados en cautividad, estudiando medios de dilución apropiados, tiempos de conservación e incluso valorar su posibilidad de refrigeración. En este trabajo se presentan resultados preliminares de estos parámetros y de pruebas *in vivo* inseminando con semen refrigerado en distintos tipos de conejas.

Abstract

Cynegetic farm dedicated to production of wild rabbits in Spain is an activity that increases with the aim to reposition in hunting lands and to maintain endangered predators and thereby preserve Mediterranean ecosystem diversity. To apply the benefits of artificial insemination technique on cynegetic rabbitries is necessary a preliminary study of seminal parameters of wild rabbit male reared in captivity. In this study we determine seminal parameters of crossbred wild rabbit, semen collection frequency and the effect of cooling on the semen quality and fertility *in vivo*.

Introducción

En España existen granjas dedicadas a la cría cinegética de conejos de monte cuyo objetivo es la reposición de esta especie en los cotos de caza, mantener a depredadores, y en consecuencia preservar la diversidad del ecosistema mediterráneo. Sin embargo, la producción del conejo de monte es complicada ya que se trata de un animal fuertemente influido por las condiciones de luz y temperatura, siendo sus parámetros reproductivos bastante pobres en cautividad (Eisermann, 1988). Actualmente, la mayoría de las granjas cinegéticas contienen animales cruzados de capa similar pero de mayor tamaño y que se adaptan mejor a la cría en jaula y tienen un mayor número de gazapos por camada (González, 2001).

El conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) de la península ibérica sostiene un gran número de especies depredadoras y genera económicamente una importante actividad de caza, con alrededor de 30.000 áreas privadas de la misma (Villafuerte et al., 1998). Aunque en muchos países es necesario controlar su reproducción y extensión, en el sudoeste de Europa el número de conejos de monte ha decrecido. Las principales causas que han ocasionado la merma en las poblaciones de conejo de monte son las enfermedades (mixomatosis y hemorragia vírica) y la depredación. Resulta caro y difícil realizar repoblaciones de una manera efectiva y a esto se añade la introducción que se hace de animales que no son genéticamente puros. Para hacer buenas repoblaciones sería necesario emplear buenos ejemplares procedentes de animales con la mayor pureza genética posible. Según Monnerot et al. (1994), los análisis genéticos revelan grandes diferencias entre los conejos del sudoeste europeo y los de otras regiones. Cualquier esquema de selección de una especie se basa en el uso de la inseminación artificial para la obtención de valores genéticos en todos los animales.

La inseminación artificial es un instrumento que ha permitido introducir multitud de mejoras en las especies ganaderas. Los sementales multiplican su capacidad fecundante ya que de un sólo macho se obtienen varias dosis seminales contrastadas que permiten la evaluación y difusión de machos de alto valor genético.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar los parámetros seminales de conejos de monte de la granja cinegética Cunicinca en los que, con un ritmo intensivo de recogidas (4 veces por semana), se realizaron pruebas de integridad espermática, de dilución y conservación, con el propósito de poner a punto la técnica de inseminación artificial en esta especie. Más a largo plazo, y dado que la obtención de sementales con altos valores genéticos es uno de los principales objetivos de los programas de mejora genética (Alenda y Chafferdine, 1997), se podrían utilizar los conocimientos adquiridos para complementar estudios genéticos de las poblaciones de conejo de monte que existen en España

y poder realizar repoblaciones efectivas.

Material y métodos

Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones que posee la empresa Cunicinca. En la primera parte de este trabajo se emplearon 10 machos adultos con un peso medio no superior a 1000 g que tras el destete se alojaron en jaulas individuales, con un fotoperiodo de 15 horas de luz y 9 de oscuridad y se alimentaron con un pienso comercial ad libitum. Cuando comenzó el experimento todos los animales estaban adaptados a la recogida de dos eyaculados a la semana con vagina artificial y se procedió a incrementar el ritmo de recogida a dos eyaculados por día, dos veces a la semana durante un mes. La recogida se realizaba en la jaula del macho utilizando una hembra como maniquí, tal y como se describe por Rebollar (1993). La vagina artificial empleada era de silicona, calentada en seco, y adaptada a un tubo colector de vidrio estéril y seco. Una vez recogidos los eyaculados fueron valorados por el mismo técnico. Los parámetros macroscópicos que se analizaron fueron el color, desechándose los eyaculados con coloraciones anormales (rojiza, amarillenta o marrón), la presencia o ausencia de gel y el volumen en ausencia de gel. Los parámetros microscópicos fueron la concentración, la motilidad, la integridad de la membrana de la cabeza del espermatozoide con el test de exclusión de la eosina (E.E.T), y la integridad de la membrana del flagelo con el Hypoosmotic Swelling Test (HOST). La concentración fue determinada con cámara de Bürker y la motilidad fue observada inmediatamente después de la recogida y por el mismo operador a 100 aumentos, asignándole un valor entre 1-4 de acuerdo al porcentaje aproximado de espermatozoides móviles (1 (0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) y 4 (76-100%)) (Rebollar, 1993). El E.E.T se realizó mezclando 100 μ l de semen con 200 μ l de Eosina al 1%, y añadiendo 100 μ l de Nigrosina como colorante de contraste. Los espermatozoides con alteraciones estructurales en la membrana aparecían con la cabeza teñida de rojo. Para el HOST se mezclaron 100 μ l de cada muestra de semen con 900 μ l de una solución hipoosmótica de fructosa (60mOsmol), tal y como describe Ducci et al. (2002). Los espermatozoides con una membrana funcional, aparecieron con el flagelo curvado. En ambas pruebas se contaron un mínimo de 150 espermatozoides.

En una segunda parte del experimento, de los eyaculados valorados, aquellos que presentaron una motilidad superior o igual a 3 se mezclaron para constituir un pool. Cada pool fue dividido en tres y cada división fue diluida a la quinta parte (una parte de semen y 5 de diluyente) empleando para ello un diluyente distinto: diluyente comercial (MA24, Ovejero, León, España), un tampón orgánico con sacarosa como componente energético (CUNI-S) al que se añadía gelatina para su solidificación a 18° C y el mismo sin gelatina (CUNI-L). Con el fin de ver las pérdidas de integridad que se producen en el proceso de dilución y de refrigeración del semen, la motilidad masal, la integridad de la membrana de la cabeza del espermatozoide con el test E.E.T, y la integridad de la membrana del flagelo con el test H.O.S.T. fueron realizadas en el pool y en las diluciones antes y después de la refrigeración (18°C durante 24 horas).

Por último, se procedió a realizar pruebas experimentales de inseminación con semen refrigerado a partir de eyaculados recogidos en los machos de la explotación. Con todos aquellos que presentaban un color normal y una motilidad mayor o igual a 3, se realizó un pool de semen. Tras calcular la concentración del mismo con cámara de Bürker, se procedió a dividir el pool en tres partes que fueron diluidas y conservadas durante 24 horas a 18° C. Los diluyentes empleados fueron los mismos enumerados anteriormente. De esta forma se obtenían envases en los que se almacenaban dosis seminales con 20 a 30 millones de espermatozoides en volúmenes de 0,7 ml.

Las hembras a inseminar estaban alojadas en otra nave con jaulas tipo flat-deck. Se realizó un total de 538 inseminaciones en conejas múltiparas en día 21 post-parto lactantes (225), no lactantes (93) y negativas de una inseminación anterior (219). Sólo se inseminaron las hembras que presentaban un buen estado sanitario (ausencia de mamitis, retenciones fetales, diarreas, etc) y con un color de vulva rosáceo. La deposición del semen se realizó con pistola de inseminación, utilizando camisas de un solo uso para cada coneja. La inducción de ovulación se realizó con 1 mg de GnRH (acetato de buserelina), en un volumen de 0,5 ml de suero glucosalino, intramuscular e inmediatamente después de la inseminación artificial. Sólo se determinó el resultado de la palpación abdominal 21 días post-inseminación.

Todos los animales se trataron según los principios de manejo de animales en experimentación descritos por el Real Decreto Español 223/88.

El análisis de los resultados se realizó con el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; 1999-2001). Las variables con distribución normal (volumen, concentración, porcentajes de integridad de membrana por eyaculado), fueron analizados según el procedimiento de modelos lineales general (GLM) estudiando efectos fijos como semana de recogida, nº de salto, tipo de diluyente o tiempo de conservación. Las que no tenían distri-

bucción normal (motilidad, fertilidad) por el modelo para variables discretas (CATMOD) estudiando los mismos efectos fijos citados anteriormente y el tipo de coneja inseminada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

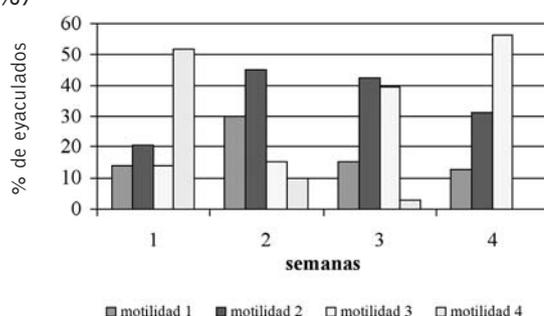
A partir de los 10 machos del experimento y durante un mes, se analizaron 137 eyaculados, un 86% del total. El 14% restante correspondió a saltos que no se llevaron a cabo o que fueron desechados por escaso volumen, color inapropiado o contaminados.

El volumen medio obtenido fue de $0,40 \pm 0,016$ ml. Este volumen es un 44% superior al obtenido de animales más jóvenes con un ritmo de recogida de una vez a la semana (Dávila et al., 2003). No hubo diferencias significativas ni entre semanas, ni entre saltos. Tampoco en el caso del color. El 58% de los eyaculados del primer salto presentaron gel, mientras que en el segundo el porcentaje descendió a un 6%.

La motilidad media observada subjetivamente con una escala de 1 a 4 fue de 2,4. Valores similares (2,3), se observaron en esta especie cuando están sometidos a un ritmo extensivo de recogida (Dávila et al., 2003). En este experimento no se encontraron diferencias significativas entre saltos, aunque la primera semana la motilidad media fue significativamente superior al resto ($P < 0.05$), tal y como se aprecia en la Figura 1.

El porcentaje de eyaculados que presentaron una motilidad superior o igual a 3 disminuyó del 66 al 25%, de la primera a la segunda semana, respectivamente. A partir de la tercera semana, la motilidad mejoró y aumentó el porcentaje de eyaculados con motilidad 3 con respecto a la segunda ($P = 0.0005$). Bencheikh et al. (1995), encontraron un incremento del volumen y de la motilidad en un ritmo de recogida extensivo frente a un ritmo intensivo. A pesar de la sencillez en la estimación de la motilidad, su validez es bastante limitada ya que existe una gran variabilidad en la estimación de los parámetros de motilidad incluso en los mismos eyaculados (Verstegen et al., 2002).

Figura 1: Variación de la motilidad del semen de 10 conejos de monte con un ritmo de recogida de 2 eyaculados, 2 veces por semana, de acuerdo al porcentaje de saltos que presentan motilidad 1 (0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) y 4 (76-100%)



La concentración media obtenida de los eyaculados analizados fue de $416,34 \pm 21,8$ millones de espermatozoides/ml. La concentración media del segundo salto fue mayor a la del primero, ($491,30 \pm 32,09$ vs. $387,84 \pm 29,77$ millones de espermatozoides/ml, respectivamente; $P < 0,05$). La variación de la concentración semana a semana y la relación entre la misma y el color de los eyaculados se muestran en las Tablas 1 y 2.

Los mismos animales sometidos a ritmos menos intensivos (Dávila et al., 2003), produjeron eyaculados más concentrados ($618 \pm 81,3$; $P < 0.05$). Esta disminución y la que se observa a medida que avanzan las semanas del experimento podría estar asociada al descenso que se produce de las reservas espermáticas en el epidídimo, descritas por Bencheikh et al. (1995), que también se pueden apreciar en el conejo de carne (Arroita, 2000).

Tabla 1: Concentración (espermatozoides /ml) del semen de conejos de monte sometidos a un ritmo de recogida de 2 eyaculados, 2 veces por semana.

semana	n	concentración	EEM
1	30	$631,12^a$	46,13
2	40	$411,25^b$	39,95
3	34	$428,48^b$	43,33
4	33	$287,44^c$	43,98

a, b y c indican diferencias significativas, $P < 0,05$.

EEM: error estándar de la media.

Tabla 2: Relación entre el color del eyaculado y la concentración (millones de espermatozoides/ml) del semen de conejos de monte sometidos a un ritmo de recogida de 2 eyaculados, 2 veces por semana.

Color	n	concentración	EEM
Gris	18	152,00 ^c	65,25
Blanco	90	374,77 ^b	26,64
Crema	29	682,07 ^a	46,93

a, b y c indican diferencias significativas, P<0,05.

EEM: el error estándar de la media.

Estudios similares realizados con animales más jóvenes con un ritmo semi-intensivo de recogida, asignaron una concentración superior a cada color (215,2±96, 504,8±68, 1091,5±81 millones de espermatozoides/ml para el color gris, blanco y crema, respectivamente). Aunque fueron determinados por el mismo operador en ambos experimentos y se observó una correlación significativa entre el color y la concentración, no deja de ser una valoración subjetiva. Hay que hacer constar, no obstante, que se observó un elevado grado de impurezas en el plasma seminal de estos machos adultos. Precisamente los restos celulares y otras partículas son abundantes en el semen de conejo. Por esta razón, inducen a error cuando se aplican técnicas como la espectrofotometría y el análisis de imagen para determinar las concentraciones espermáticas en esta especie (Vicente, 2003). Éste también podría ser el motivo de por qué el segundo eyaculado no presentó una coloración más intensa que el primero.

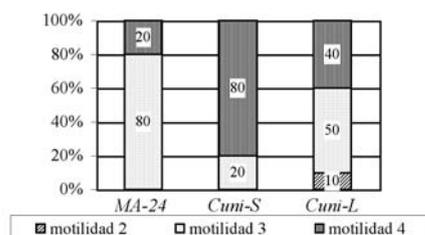
Por último, el número medio de espermatozoides/eyaculado obtenido a lo largo de las cuatro semanas fue de 169,82±12,40.

A partir de los eyaculados que tenían características seminales parecidas, (motilidad superior o igual a 3 y un color normal), el porcentaje medio de espermatozoides/eyaculado que presentaron la membrana de la cabeza intacta fue del 81,18±1,31%. No aparecieron diferencias significativas entre los eyaculados ni entre éstos y el pool. Con las tinciones se puede determinar si la membrana del espermatozoide está dañada, dándonos una valoración de su viabilidad. En otras especies se ha observado cierta correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides vivos y la fertilidad in vivo (Januskauskas et al., 2001). El resultado obtenido en cuanto al porcentaje de espermatozoides que se tiñen con eosina era el esperado, teniendo en cuenta que se valoraron los eyaculados con una motilidad mayor o igual a 3.

El porcentaje de espermatozoides/eyaculado que presentaron la membrana del flagelo intacta fue del 77,03±1,59%. La capacidad que tienen las membranas de las células animales para transportar solutos selectivamente determina la capacidad de este test para determinar la funcionalidad de las células espermáticas. La correlación con la fertilidad ha sido poco estudiada en semen de conejos, aunque al ser un análisis tan sencillo suele formar parte de los tests de viabilidad cuando se valora el semen de las distintas especies zootécnicas.

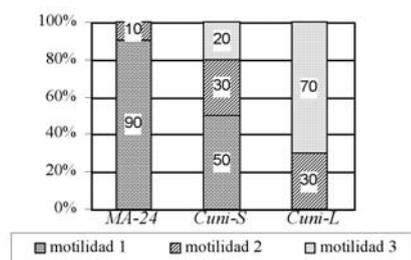
Después de realizar las diluciones, se estudió la motilidad espermática con los tres diluyentes y el efecto de la dilución sobre la integridad del espermatozoide antes de la refrigeración. La motilidad en los tres casos fue elevada (valores entre 3 y 4), apareciendo diferencias significativas entre diluyentes (P=0,0024), tal y como se muestra en la Figura 2. Los datos obtenidos demuestran que la mejor motilidad se obtuvo con el diluyente sólido.

Figura 2: Relación entre el diluyente (MA-24, Cuni-S, Cuni-L) y la motilidad [1(0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) y 4 (76-100%)] del semen diluido antes de la refrigeración.



Después del proceso de refrigeración, aparecieron diferencias significativas en la motilidad de los eyaculados para los distintos diluyentes (P<0.0001). En el 100% de las diluciones con el diluyente comercial y en el 80% de las diluciones del diluyente sólido, la motilidad bajó de valores comprendidos entre 3 y 4 a valores comprendidos entre 1 y 2 (Figura 3). En el caso del tampón líquido la motilidad durante la refrigeración empeoró un 20%.

Figura 3: Efecto del tipo de diluyente (1: MA24, 2: Cuni-S y 3: Cuni-L) y de la refrigeración (18°C, 24 horas), sobre el porcentaje de eyaculados con una motilidad 1(0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) y 4 (76-100%)



Los porcentajes de espermatozoides que mostraron alguna alteración de membrana al ser sometidos a los tests E.E.T. y H.O.S.T., se muestran en la Tabla 3. El diluyente, así como la refrigeración a 18°C durante 24 horas afectó de manera similar a la integridad de las membranas de los espermatozoides diluidos.

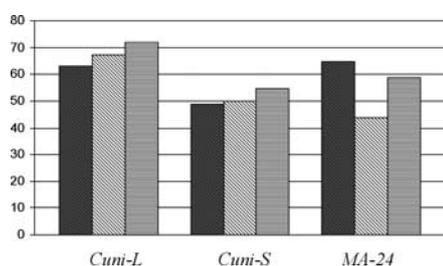
Tabla 3: Integridad de la membrana de la cabeza (EET) y del flagelo (HOST) de los espermatozoides diluidos antes y después de la refrigeración a 18° C durante 24 horas con tres tipos de diluyentes.

	E.E.T(%)		H.O.S.T(%)	
	antes	después	antes	después
MA24	79,15	66,39	73,71	64,10
Cuni-S	74,70	61,56	75,33	66,12
Cuni-L	78,00	61,69	73,77	73,84

Todas estas pruebas laboratoriales nos pueden ayudar a conocer la capacidad fecundante de las dosis seminales. Sin embargo, la fertilidad no depende sólo del macho ya que el comportamiento de las células espermáticas puede cambiar en el tracto genital femenino. Además, los procesos que llevan a la interacción de los dos gametos son múltiples y muy complejos (Verstegen et al., 2002), por lo que las pruebas *in vivo* son las que aportan más información.

No se encontraron diferencias en los resultados de fertilidad obtenidos con semen refrigerado según el tipo de coneja inseminada (Figura 4). Las dosis seminales empleadas (entre 20-30 millones), se consideran suficientes para obtener aceptables resultados de fertilidad con semen refrigerado (Alvariño et al., 1998; Roca et al., 2000) La fertilidad media obtenida con el diluyente Cuni-L fue significativamente más alta que la obtenida con el diluyente Cuni-S o con el diluyente comercial (66,3% vs. 54,9% o 51,02% respectivamente; $P < 0,0149$).

Figura 4. Porcentaje de fertilidad de conejas multiparas en día 21 post-parto, lactantes o no y negativas inseminadas con semen refrigerado a 18° C durante 24 horas con distintos diluyentes.



Teniendo en cuenta el tipo de conejas inseminadas, los porcentajes de fertilidad pueden ser bajos, de acuerdo a los resultados que se están obteniendo actualmente aplicando la inseminación artificial en explotaciones comerciales. Sin embargo, ya que se trata de semen refrigerado son resultados muy alentadores. En cualquier caso, será conveniente seguir estudiando el comportamiento, manejo y optimización del conejo de monte destinado a inseminación. La inseminación artificial debe ser un medio para mejorar la difusión de animales seleccionados a las explotaciones cinegéticas y consecuentemente poder realizar las repoblaciones de manera más racional.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT mediante el proyecto PTR- 95-0567-0P.

Bibliografía

- ARROITA Z.; FALCETO M.V.; MARTÍN S.; DE ALBA S.; MORENO C.; CUIDAD J.M. (2000). Effect of collection frequency on production, quality and storage of young bucks semen. 7th World Rabbit Congress, vol A, 81-95.
- ALVARIÑO J.M.R.; LÓPEZ F.J.; DEL ARCO J.A.; BUENO A.; TORRES R. (1998). Effect of semen concentration on rabbit artificial insemination with fresh or 24 h stored semen. Proceedings of 6th World Rabbit Congress, Toulouse, vol. 1, 33-35.
- ALEND A Y CHAFFERDINE N. (1997). Mejora genética: criterios de selección. En: Vacuno de leche: aspectos claves. Bouxadé C. Ed. Mundiprensa. Pp. 237-259.
- BENCHEIKH, N., 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoides récoltés chez le lapin, Ann. Zootech., 44: 263-279.
- DÁVILA M.; BADÍA S.; REBOLLAR P.G. (2003). Parámetros seminales en el conejo de monte criado en cautividad. XXVIII Symposium de Cunicultura. Asociación Española de Cunicultura, (127-134).
- DUCCI M.; GAZZANO A.; VILLANI C.; CELA V.; ARTINI P.G.; MARTELLI F.; GENAZZANI A.R. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. Obstetrics and Gynecology 102, 53-56.
- EISERMAN K. (1988). Seasonal and environmental influences upon the diurnal Heart-rate pattern in wild rabbits living under semi-natural conditions. Physiology and Behavior, 43, (5), 559-565.
- GONZÁLEZ P. (2001). Producción del conejo silvestre en cautividad. II Jornadas Internacionales de Cunicultura. Associação Portuguesa dos Engenheiros zotécnicos (APEZ), 111-128.
- JANUSKAUSAS A.; JOHANISSON A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI buuls. Theriogenology, 55, 947-961.
- MONNEROT M.; VIGNE J.D.; BIJU-DUVAL C.; CASANE D. ; CALLOU C. ; HARDY C. ; MOUGEL F. ; SORIGUER R.C. ; DENNEBOUY N. ; MOUNOLOU J.C. (1994). Rabbit and man: genetic and historic approach. Genetics selection evolution, 26, 167-182.
- ROCA J.; MARTÍNEZ S.; VÁZQUEZ J.M.; LUCAS X.; PARRILLA I. Y MARTÍNEZ E.A. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-Buffer extenders and stored at 15°C. Animal Reproduction Science, 64, 103-112.
- REBOLLAR P.G.(1993). Inseminación artificial. Alvariño J.M.R. Control de la reproducción en el conejo. Ed Mundiprensa y Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación 65-87.
- VERSTEGEN J.; IGUER-OUADA M.; ONCLIN K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 57, 149-179.
- VICENTE J. (2003). Aplicación práctica de la inseminación artificial: organización y manejo de reproductores. Jornadas Profesionales de Cunicultura, Calella. (10.1-10.11).
- VILLAFUERTE R.; VIÑUELA J.; BLANCO J.C. (1998). Extensive predator persecution caused by population crash in a game species: the case of red kites and rabbits in Spain. Biological Conservation, 84, 181-188.