

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**MÁSTER OFICIAL EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**Efecto de la selección por ganancia  
media diaria durante el engorde sobre  
la calidad espermática en conejo**

Tesis de fin de máster presentada por:

**MISAEI RODRÍGUEZ CAPCHA**

**DIRECTOR:**

**Dr. FRANCISCO MARCO JIMÉNEZ**

**Valencia, Septiembre de 2016**

## RESUMEN

La producción comercial de conejos de carne se basa en obtener gazapos de cebo derivadas del cruce entre dos líneas maternas y una paterna (cruce a tres vías). En la actualidad, las hembras híbridas son inseminadas con dosis de semen de machos de líneas paternas alojados en centros de inseminación artificial. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la selección por ganancia media diaria desde el día 28 a la edad de 63 días sobre la calidad espermática en una línea paterna de conejo.

El experimento se realizó con un total de 24 conejos de la línea R, línea paterna seleccionada por ganancia media diaria (durante 36 generaciones) entre 28 y 63 días de edad. Para llevar a cabo el experimento los animales se agruparon en dos grupos experimentales, un grupo de 8 conejos de la generación 18 (año 2000) y 16 conejos de la generación 36 (año 2015). Las características seminales de todos los machos se evaluaron, partiendo desde la valoración inicial, descartando los eyaculados no aptos. Se valoraron las características de producción seminal: volumen (ml), concentración ( $10^6$  spz/ml) y producción ( $10^6$  spz/eyaculado) y la calidad espermática: porcentaje de espermatozoides móviles (MOT), viabilidad, porcentaje de espermatozoides anormales (ANR), porcentaje de espermatozoide con el acrosoma intacto (NAR) y porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática (GOTA). Se evaluaron también los parámetros cinéticos asistido por el CASA (Computer Assisted Sperm Analysis): porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de la cabeza (BCF). Finalmente se realizó la evaluación in vivo de la calidad seminal, evaluando la fertilidad (palpación y al parto) y la prolificidad.

Nuestros resultados mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el volumen del eyaculado ( $0.7 \pm 0.06$  mL frente a  $0.9 \pm 0.41$  mL) y en la producción ( $122.8 \pm 19.67 \times 10^6$  spz/eyaculado frente a  $184.0 \pm 12.60 \times 10^6$  spz/eyaculado) entre la generación 18 y 36 respectivamente. Respecto a las características espermáticas de MOT, ANR, NAR, Viabilidad y parámetros de cinética espermática no se observaron diferencias significativas entre ambas generaciones. Estos resultados fueron contrastados con la evaluación de la fertilidad y la prolificidad, observándose que no hay diferencias significativas entre ambas generaciones para la fertilidad (evaluadas a palpación y al parto;  $60.0 \pm 6.1$  frente a  $66.0 \pm 5.0$  y  $54.0 \pm 6.3$  frente a  $61.0 \pm 5.2$  para la generación 18 y 36 respectivamente), y en la prolificidad (nacidos vivos y nacidos muertos) entre los machos de la generación 18 y 36 ( $6.0 \pm 0.60$  frente a  $5.7 \pm 0.46$  y  $0.9 \pm 0.24$  frente a  $0.8 \pm 0.18$  para la generación 18 y 36 respectivamente).

En conclusión, en base a los resultados obtenidos, la ganancia media diaria influye sobre la producción espermática, aunque no hay alteraciones en la calidad seminal.

**Palabras clave:** Conejo, selección, espermatozoide, ganancia media diaria.

## ABSTRACT

Commercial production of meat rabbit is based on obtain bait kits derived from the crossing between two maternal lines and one paternal (three-way crossing). Currently, the hybrid females are inseminated with semen doses of paternal lines housed in artificial insemination centres. The aim of this study was to evaluate the effect of selection for average daily gain from day 28 at the age of 63 days on sperm quality in a rabbit paternal line.

The experiment was performed with a total of 24 rabbits of the line R, paternal line selected by average daily gain (for 36 generations) between 28 and 63 days of age. To carry out the experiment, the animals were grouped in two experimental groups, a group of 8 rabbits generation 18 (2000) and 16 rabbits generation 36 (2015). Seminal characteristics of all males were evaluated from the initial assessment, discarding the unsuitable ejaculates. Were assessed the features of seminal production: volume (ml), concentration ( $10^6$  spz/ml) and production ( $10^6$  spz/ejaculate) and the sperm quality: percentage of sperm motile (MOT), viability, percentage of sperm abnormal (ANR), percentage of sperm with the acrosome intact (NAR) and percentage of sperm with drop cytoplasmic (DROP). They were also evaluated the kinetic parameters assisted by the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis): percentage of sperm with motility progressive (MP), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), index of linearity (LIN), index of straightness (STR), index of wobble (WOB), amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF). Finally, the evaluation was performed in vivo semen quality, assessing fertility (palpation and childbirth) and prolificacy.

Our results showed significant differences ( $P < 0.05$ ) in the ejaculate volume ( $0.7 \text{ mL} \pm 0.06$  versus  $0.41 \pm 0.9 \text{ mL}$ ) and production ( $122.8 \pm 19.67 \times 10^6$  spz/ejaculated vs.  $184.0 \pm 12.60 \times 10^6$  spz/ejaculated) between generation 18 and 36 respectively. Regarding sperm characteristics of MOT, ANR, NAR, sperm viability and kinetic sperm parameters not showed significant differences between both generations. These results were compared with the assessment of fertility and prolificacy, observed no significant differences between the two generations for fertility evaluated palpation and childbirth ( $60.0 \pm 6.1$  vs  $66.0 \pm 5.0$  and  $54.0 \pm 6.3$  vs  $61.0 \pm 5.2$  for the generation 18 and 36 respectively) and prolificacy (born alive and stillbirths) among males generation 18 and 36 ( $6.0 \pm 0.60$  vs.  $5.7 \pm 0.46$  and  $0.9 \pm 0.24$  vs  $0.8 \pm 0.18$  for generation 18 and 36 respectively).

In conclusion, based on the results, the average daily gain influence sperm production, although there was not alterations in semen quality.

Key words: rabbit, selection, sperm, average daily gain.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han participado en desarrollo y elaboración de esta tesis, y en especial:

A mi director de tesis Dr. Francisco Marco Jiménez, quien ha dirigido mi trabajo fin máster, por la oportunidad, tiempo, conocimiento y paciencia que me ha brindado para poder realizar este proyecto y así finalizar mis estudios de Postgrado. Agradecer también al Dr. Jose Salvador Vicente Antón, quien supo aclararme las dudas surgidas durante el desarrollo de la parte experimental realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

A mis compañeros de laboratorio: Ximo, Carmen, Pedro, Marta, Jesús, Jose y Luis, por el trato recibido, con quienes he compartido laboratorio durante el proceso experiemetal.

A todos y cada uno de mis profesores del Máster de Producción Animal, quienes con su sapiensa pudieron guiarme por el sendero de los nuevos conocimientos.

A mis compañeros del Máster de Produccion Animal, por la amistad brindada durante toda mi estancia, con quienes formé un bonito lazo de amistad y que estoy seguro que perdurará en el tiempo.

A toda mi familia, padres, hermanas y sobrinos por todo su apoyo, sin el cual yo no sería la persona que soy.

Un gran reconocimiento al Programa Nacional de Becas y Credito Educativo (PRONABEC - PERÚ); quienes apuestan por la investigación e innovación de los conocimientos científicos; quedo inmensamente agradecido por haber gozado de la beca brindada, ya que sin ello no habria sido posible la realización este de trabajo de investigación.

Gracias a todos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Líneas de conejo	1
1.1.1. Selección por ganancia media diaria (línea R)	2
1.1.1.1. Características productivas de la línea R	2
1.1.1.2. Características reproductivas de la línea R	3
1.1.1.3. Efecto de la ganancia media diaria en caracteres reproductivos	3
1.2. Técnicas de valoración del eyaculado y calidad espermática	4
1.2.1. Apariencia del eyaculado	5
1.2.2. Características de la cantidad espermática	5
1.2.2.1. Volumen del eyaculado	5
1.2.2.2. Concentración espermática	5
1.2.3. Característica de la calidad espermática	6
1.2.3.1. Motilidad	6
1.2.3.2. Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide	8
1.2.3.3. Morfología espermática	9
1.2.3.4. Morfometría espermática	10
1.2.3.5. Estado del acrosoma	10
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1. Animales	12
3.2. Recuperación de eyaculados	12
3.3. Evaluación de las características seminales	13
3.3.1. Valoraciones macroscópicas	13
3.3.2. Valoraciones microscópicas	13
3.3.2.1. Motilidad	15
3.3.2.2. Viabilidad	16
3.3.2.3. Concentración	17
3.3.2.4. Morfología y evaluación del estado acrosomal	18
3.4. Fertilidad y prolificidad	19
3.5. Diseño experimental	19
3.6. Análisis estadístico	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>22</b>
4.1. Estadísticos descriptivos	22
4.2. Características de producción seminal	23
4.3. Parámetros de calidad espermática	24
4.4. Parámetros cinéticos de la motilidad espermática	26
4.5. Análisis de fertilidad y prolificidad	28
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>6. CITAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Líneas de conejo fundados en la UPV-----	<b>1</b>
<b>Tabla 2.</b> Características del eyaculado-----	<b>5</b>
<b>Tabla 3.</b> Parámetros cinéticos de motilidad espermática (adaptado de Quintero- Moreno, 2003) -----	<b>7</b>
<b>Tabla 4.</b> Características de calidad espermática-----	<b>8</b>
<b>Tabla 5.</b> Características de morfología y morfometría espermática en conejo de la línea R -----	<b>9</b>
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de morfometría espermática-----	<b>10</b>
<b>Tabla 7.</b> Configuración del CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)-----	<b>16</b>
<b>Tabla 8.</b> Estadísticos descriptivos de las características de producción y calidad espermática-----	<b>22</b>
<b>Tabla 9.</b> Estadísticos descriptivos de los parámetros cinéticos de motilidad-----	<b>23</b>
<b>Tabla 10.</b> Características de cantidad espermática ( $lsm \pm e.s$ )-----	<b>24</b>
<b>Tabla 11.</b> Características de calidad espermática ( $lsm \pm e.s$ )-----	<b>25</b>
<b>Tabla 12.</b> Parámetros cinéticos de la motilidad espermática ( $lsm \pm e.s$ ) -----	<b>26</b>
<b>Tabla 13.</b> Ratios cinéticos de la motilidad espermática ( $lsm \pm e.s$ ) -----	<b>27</b>
<b>Tabla 14.</b> Tasa de fertilidad y prolificidad ( $lsm \pm e.s$ )-----	<b>29</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del cruce a tres vías (adaptado de Blasco et al., 1984) -----	2
<b>Figura 2.</b> Vagina artificial armada-----	12
<b>Figura 3.</b> Muestra de semen apto (izquierda) y no apto: orina (centro) y sangre (derecha)-----	13
<b>Figura 4.</b> Flujograma resumen de la evaluación seminal-----	14
<b>Figura 5.</b> Cámara Makler para la evaluación de motilidad espermática-----	15
<b>Figura 6.</b> Parámetros cinéticos de motilidad obtenidos por el sistema CASA -----	16
<b>Figura 7.</b> Imagen tomada a 400x. Con el filtro B-2A se observan las células viables (A) y con el filtro G-2A se observan las células no-viables (B)-----	17
<b>Figura 8.</b> Evaluación del estado del acrosoma. (A) Borde apical reaccionado o dañado (DAR); (B) borde apical normal o intacta (NAR). Imagen observada a un aumento de 400x -----	18
<b>Figura 9.</b> Morfología espermática en conejos: (a) forma normal; (b) cola enrollada; (c) cabeza suelta; (d) gota citoplasmática y (e) cabeza piriforme. Observadas a un aumento de 400x-----	19
<b>Figura 10.</b> Inseminación artificial de las hembras receptoras -----	19
<b>Figura 11.</b> Esquema del diseño y organización experimental -----	20
<b>Figura 12.</b> Imagen de las trayectorias cinéticas del espermatozoide analizadas por el CASA-----	26

## GLOSARIO

<b>ADN:</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico.</i>
<b>ANR:</b>	<i>Espermatozoide anormales</i>
<b>ALH:</b>	<i>Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.</i>
<b>BCF:</b>	<i>Frecuencia de batida de la cabeza.</i>
<b>BSA:</b>	<i>Albúmina Sérica Bovina</i>
<b>CASA:</b>	<i>Computer Assisted Sperm Analysis.</i>
<b>CV:</b>	<i>Coeficiente de Variabilidad.</i>
<b>°C:</b>	<i>Grados centígrados.</i>
<b>DAR:</b>	<i>Espermatozoides con borde apical dañado</i>
<b>DS:</b>	<i>Desviación Estándar.</i>
<b>DMSO:</b>	<i>Dimetil Sulfoxido.</i>
<b>GLM:</b>	<i>Modelo lineal general</i>
<b>GMD:</b>	<i>Ganancia Media Diaria</i>
<b>Hz:</b>	<i>Hertz.</i>
<b>ISAS:</b>	<i>Sistema integrado de análisis de semen.</i>
<b>I.A:</b>	<i>Inseminación Artificial</i>
<b>IC:</b>	<i>Índice de conversión</i>
<b>IP:</b>	<i>Ioduro de Propidio</i>
<b>LIN:</b>	<i>Índice de Linealidad.</i>
<b>MOT:</b>	<i>Motilidad</i>
<b>MP:</b>	<i>Motilidad progresiva</i>
<b>mL:</b>	<i>Mililitro.</i>
<b>mm:</b>	<i>Milímetro.</i>
<b>NAR:</b>	<i>Espermatozoides con borde apical normal</i>
<b>NL:</b>	<i>Nitrógeno Líquido.</i>
<b>PV:</b>	<i>Peso vivo.</i>
<b>PI:</b>	<i>Pieza intermedia.</i>
<b>SRT:</b>	<i>Índice de Rectitud.</i>
<b>TCG:</b>	<i>Tris-Cítrico-Glucosa.</i>
<b>TRA:</b>	<i>Tecnología de reproducción asistida</i>
<b>VCL:</b>	<i>Velocidad Curvilínea.</i>
<b>VSL:</b>	<i>Velocidad Rectilínea.</i>
<b>VAP:</b>	<i>Velocidad Media.</i>
<b>WOB:</b>	<i>Índice de Oscilación.</i>
<b>µm:</b>	<i>Micrómetro.</i>



## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 60-70's cuando se dió inicio a la cunicultura industrial en España, acentuándose años más tarde con la incorporación de los programas de mejora genética, en base a la selección de criterios de importancia económica, como velocidad de crecimiento, tamaño de camada, peso al destete y otros criterios (Mínguez, 2012). En la actualidad se dispone de líneas muy especializadas entre las que destaca la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento, línea impulsada por los investigadores de la Universidad Politécnica de Valencia (Estany et al., 1992). Estas líneas especializadas poseen caracteres productivos muy favorables, que bajo el esquema piramidal (cruce a tres vías) y la aplicación de tecnología reproductiva permite una rápida difusión genética (Rochambeau, 2000). Sin embargo, en el caso concreto de las líneas paternas estas poseen algunas peculiaridades y dificultades reproductivas como: inicio reproductivo tardío (Lavara et al., 2003), menor líbido y baja calidad espermática (Vicente et al., 2000). Respecto a la hembra, estas presentan fallos en la ovulación, en la implantación embrionaria, menor tamaño de camada (Vicente et al., 2012, 2013; Naturil-Alfonso et al., 2015, 2016)

### 1.1. Líneas de conejo

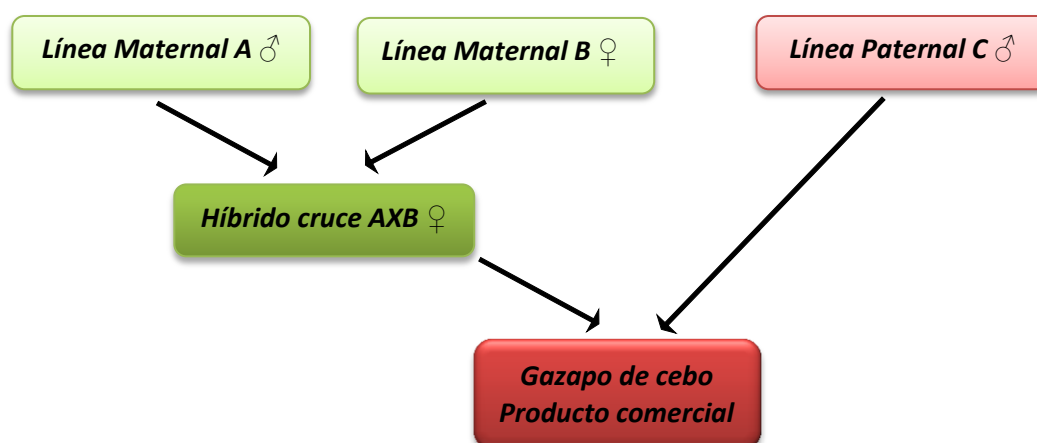
Existe un centenar de líneas de conejo, que clasificadas de acuerdo a su peso vivo adulto pueden agruparse en: pesadas (más de 5 kg), medianas (3,5-4,5 kg), ligeras (2,5-3 kg) y enanas (alrededor de 1 kg). Para la producción de carne bajo sistemas intensivos, se emplean principalmente líneas obtenidas a partir de razas medianas, de estas razas las más difundidas son la Californiana y la Neozelandesa Blanca (González y Caravaca, 2015). El grupo de investigadores de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), han fundado varias líneas especializadas, seleccionados por diferentes criterios productivos, dentro de las cuales se encuentra las líneas maternas seleccionadas por tamaño de camada al destete (A, V, H y LP), y la línea paternal seleccionada por ganancia media diaria desde el día 28 al 63 (R), un resumen se muestra en la tabla 1. Estas líneas se utilizan para obtener gazapos comerciales de cebo, aplicando el cruce a tres vías.

**Tabla 1.** Líneas de conejo fundados en la UPV.

Línea	Criterio de selección	Origen	Referencia	Año fundación	Generación de selección 2015
<b>A</b>	Tamaño de camada al destete	Neozelandés	Estany et al., (1989)	1976	46
<b>V</b>	Tamaño de camada al destete	4 líneas maternas	Estany et al., (1989)	1981	41
<b>H</b>	-Hiperprolificidad -Tamaño de camada al destete	Gran población de animales	Cifre et al., (1998)	1996	24
<b>LP</b>	-Hiperlongevidad -Tamaño de camada al destete	Gran población de animales	Sánchez et al., (2008)	2005	11
<b>R</b>	Ganancia media diaria (velocidad de crecimiento)	2 líneas (California y línea paternal)	Estany et al., (1992)	1984	36

### 1.1.1.1. Selección por ganancia media diaria (línea R)

El desarrollo de líneas conocidas como “maternales” y “paternales” es un punto crucial en los programas de mejora (Baselga, 2004). La organización de los programas de mejora genética en conejos es de un esquema piramidal, donde la cúspide la ocupa líneas maternales y paternales especializadas (Rochambeau, 2000). Por ejemplo, la línea R es la línea paternal que se usa frecuentemente como macho terminal en el cruce a tres vías (ver figura 1). Esta línea se fundó a través de la fusión de dos líneas, una fundada en el año 1976, con conejos de la raza California y la otra fundada en 1981 a partir de líneas paternales especializadas (Estany et al., 1992). La línea R se selecciona por velocidad de crecimiento entre los 28 y 63 días. El objetivo de la selección por ganancia media diaria (GMD) es mejorar indirectamente el índice de conversión (IC), por estar ambos caracteres correlacionados negativamente (Piles et al. 2004). En los últimos años, estas líneas han sido ampliamente difundidas como macho terminal en el cruzamiento a tres vías de la mano de la inseminación artificial (IA).



**Figura 1.** Esquema del cruce a tres vías (adaptado de Blasco et al., 1984).

### 1.1.1.2. Características productivas de la línea R

El carácter más importante de selección en los programas de mejora genética en líneas paternales de conejo es el IC, por su importancia desde el punto de vista económico (Armero y Blasco, 1992). Sin embargo, pese a su importancia, el IC es un carácter costoso y difícil de medir (instalaciones y mano de obra), pero la velocidad de crecimiento desde el destete al sacrificio es más fácil y económico de determinar. Piles et al., (2004) observaron que existe una correlación genética negativa entre velocidad de crecimiento e IC de -0.47 en la línea R, por esta razón se utiliza como criterio de selección la velocidad de crecimiento expresado en GMD. Bajo este criterio de selección se puede mejorar aproximadamente 0,4-0,6 g/d por generación seleccionada, lo que conlleva como principales consecuencias una mejora del IC, aunque también a un aumento indeseable del tamaño adulto (Blasco et al., 2003). Concretamente los animales de la línea R presentan un mayor crecimiento que el promedio de la especie cunícola (Mínguez, 2012) y una carne más tierna respecto a las líneas maternales V y A (Ariño, 2006).

### **1.1.1.3. Características reproductivas de la línea R**

Está claro que la línea R, fue seleccionado para mejorar el IC a través de la velocidad de crecimiento, para su uso en el cruce a tres vías como macho terminal, utilizando inseminación artificial (IA). Sin embargo, las aptitudes de los caracteres reproductivos de estos animales no son del todo claro, ya que algunos autores presentan resultados en muchos casos contradictorios y poco alentadores para seguir utilizando a esta línea como macho terminal.

Los machos de la línea R muestran menor producción de espermatozoides por eyaculado, menor motilidad y mayor defecto acrosomal, comparado con machos de líneas maternas A, V y H (Vicente et al., 2000). Estas características seminales, si bien permiten la difusión de semen de estos machos, no son las más idóneas (Lavara y Vicente, 2001; Viudes-de-Castro y Vicente, 1997). Por otro lado, en un estudio realizado en líneas de selección divergente por peso corporal (baja y alta), no se encontraron diferencias en la libido. Sin embargo los machos de la línea menos pesada muestran un mayor volumen de eyaculado, motilidad masal y número de eyaculados adecuados para su uso en la IA, pero con una concentración espermática menor que a los machos de la línea más pesada (Brun et al., 2006).

En líneas altamente seleccionadas por velocidad de crecimiento (por ejemplo, línea C y R) se han descrito diferencias para algunas características seminales. La línea C presentaba mejores características seminales de producción (concentración espermática y número total de espermatozoides en el eyaculado) y la línea R presentó mejores características de calidad seminales, como poca presencia de depósitos de carbonato en el eyaculado y un menor porcentaje de espermatozoides anormales (García-Tomás et al., 2006a).

De forma resumida, se podría indicar que es difícil comparar los diferentes estudios, ya que estos presentan diferentes líneas, lo que contribuye a una alta variabilidad en la producción y calidad seminal, lo que no está relacionado con la especialización de líneas maternas o paternas (Piles et al., 2013).

### **1.1.1.4. Efecto de la ganancia media diaria en caracteres reproductivos**

La eficiencia en la producción de conejos de carne depende de un gran número de características y factores, estos se pueden dividir en características relacionados con la reproducción y la producción (Baselga, 2004). Por ellos son varios los estudios que relacionan la GMD con las distintas características seminales y espermáticas, para ver los efectos que tiene seleccionar por esta característica. Muchos autores indican que no hay ninguna o poca relación entre la GMD con los caracteres de reproducción y algunos indican asociaciones con algunas de las características espermáticas.

Pascual et al., (2004) en un estudio realizado en machos de la línea R, observan que solo el 58% de los conejos destinados a IA presentaron un comportamiento sexual normal, y aproximadamente el 20% de los machos no producen muestras de semen (enfermedad, muerte y bajo libido).

Ródenas et al., (2008) observaron que la GMD no se correlaciona ni con la producción espermática (volumen y concentración), ni con la motilidad espermática (-0.05 a -0.08), concluyendo que la GMD no tiene por qué afectar en la futura producción y calidad espermática del reproductor.

Lavara et al., (2011) estimaron los parámetros genéticos de las variables relacionadas con la producción seminal y su correlación con la GMD, encontrando heredabilidades ( $h^2$ ) bajas para el volumen eyaculado, concentración y producción espermática (0.13, 0.08 y 0.07 respectivamente). También estimaron una correlación moderada positiva entre el volumen y la GMD. Estos mismos autores, en otro trabajo estimaron  $h^2$  bajas de 0.18, 0.19 y 0.12 para caracteres de calidad espermática evaluados en un espermiograma clásico como espermatozoides con acrosoma intacto (NAR), espermatozoides anormales (ANR) y espermatozoides móviles (MOT) respectivamente. Además estimaron una correlación moderada negativa de la GMD con NAR (-0.40) y MOT (-0.53) (Lavara et al., 2012).

En general, la GMD parece tener correlaciones nulas o mínimas con las características seminales y la fertilidad de los machos. Por lo tanto, se espera que la selección por GMD no debería tener consecuencias perjudiciales en los caracteres reproductivos (volumen, concentración y motilidad) de los machos de la línea R (Lavara et al., 2012; Piles et al., 2013) y se debe de tener en cuenta que la producción y la calidad de semen depende de una gran variedad de factores asociados al propio macho (Piles et al., 2013), gestión de los machos, cuestiones ambientales y genéticas (Alvariño, 2000; Brun et al., 2002).

## **1.2. Técnicas de valoración del eyaculado y calidad espermática**

La valoración del semen se realiza inmediatamente después de la colección (vagina artificial), el cual comprende una valoración macroscópica visual del aspecto del eyaculado y del volumen. Procediendo con la valoración microscópica subjetiva de la motilidad del esperma, la morfología de los espermatozoides con defectos obvios, como una medida indirecta de la viabilidad y la normalidad espermática, que se debe de realizar antes de su procesamiento (Lavara et al., 2003). Estas valoraciones permiten seleccionar aquellos eyaculados aptos y los no aptos, para posteriormente formar el pool y determinar la concentración espermática, con lo cual se calcula las dosis seminales que finalmente serán utilizados en la IA o procesos en el laboratorio.

Según varios autores (Castellini y Lattaioli, 1999; Brun et al., 2002) la evaluación de semen debe proporcionar información sobre la capacidad fecundante del espermatozoide. Dentro de los parámetros más importantes relacionados con la fertilidad está el número de espermatozoides inseminados y la motilidad. Sin embargo estas características seminales se ven afectados por muchos factores (raza, alimentación, estado de salud, condición de crianza, la estación y la frecuencia de colección), por lo tanto habrá una amplia variabilidad en las características seminales (Alvariño, 2000).

El espermiograma clásico en cunicultura se centra en mantener eyaculados con porcentajes de motilidad (superior al 70%), normalidad acrosómica (superior al 80%), gota citoplasmática (inferior al 10%) y espermatozoides anormales (inferior al 15%) y conocida la cantidad total de espermatozoides se procede a la dilución final del pool

(siempre dependiendo de la dosis de inseminación que vaya a ser utilizada), asegurando con estos valores resultados de fertilidad y prolificidad aceptables (Lavara et al., 2003). El espermiograma clásico comprende una serie de técnicas de análisis macroscópicos (volumen, color y apariencia), y microscópicos (motilidad, viabilidad, concentración, morfología, reacción acrosómica, test de endosmosis) los cuales se pueden evaluar en muestras frescas o fijadas, dependiendo del parámetro seminal a valorar.

### 1.2.1.1. Apariencia del eyaculado

Una muestra de eyaculado normal tiene un aspecto blanco opalescente homogéneo. La presencia de células rojas de la sangre (rojizo), la orina (amarillo) o sedimentos de carbonato de calcio se detecta fácilmente, e implican que estos eyaculados sean descartados. Si el eyaculado presenta un tapón de gel, este debe ser eliminado inmediatamente después de la recolección (International Rabbit Reproduction Group, 2005).

### 1.2.2. Características de la cantidad espermática

Varios estudios demuestran la gran variabilidad evidente en la producción de espermatozoides en conejos. El rango observado para las características relacionados fueron: de 0,39 a 1.19 ml de volumen, de 738 a  $146 \times 10^6$  spz/ml, para la concentración de espermatozoides, y de 477 a  $90 \times 10^6$  spz/eyaculado, siendo la concentración el parámetro más variable (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Características del eyaculado.

Característica del eyaculado	Rango	Referencia
Volumen eyaculado (mL)	0.39 - 1.19	Brun et al., (2002; 2006); Castellini et al., (2006);
Concentración espermática ( $10^6$ spz/mL)	146 – 738	García-Tomás et al., (2006a,b);
Producción espermática ( $10^6$ spz/eyaculado)	90 – 477	Lavara et al., (2010; 2011); Quintero-Moreno, (2003)

### 1.2.2.1. Volumen del eyaculado

El semen eyaculado comprende a los espermatozoides en suspensión en el plasma seminal. El volumen eyaculado se puede determinar mediante diferentes técnicas. A pesar de que se puede determinar con tubos de colecta graduado, una medición más precisa se puede realizar con el uso de una micropipeta calibrada.

### 1.2.2.2. Concentración espermática

La concentración expresa el número de espermatozoides por mililitro de eyaculado. La producción de esperma es el número total de espermatozoides en el eyaculado (ver rango de valores en la tabla 2). La concentración espermática puede valorarse empleando distintos métodos como: hemocitómetro (Büker, Thoma, Naubauer) espectrofotometría, citometría de flujo o equipos CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

En muchas especies animales, la concentración espermática es evaluada mediante espectrofotometría, pero el semen del conejo contiene muchas partículas seminales (carbonato de calcio) que hacen de este tipo de análisis poco fiables (Castellini et al., 2007). Por esta razón en la actualidad el método más fiable, simple y difundido para el recuento del número de espermatozoides en el conejo es el hemocitómetro. Sin embargo, resultados obtenidos en la cámara de recuento celular presentan mayor coeficiente de variación (12.3%) que en el espectrofotómetro (2.9%) y que la citometría de flujo (2.3%) lo cual ha llevado a afirmar que el espectrofotómetro y la citometría de flujo son las técnicas más precisas para el recuento espermático (Quintero-Moreno, 2003). Precisamente Castellini et al., (2007) validaron el método espectrofotométrico para determinar la concentración espermática en conejos y lo compararon con el más usado (hemocitómetro). Los resultados del método espectrofotométrico se correlacionaron con los resultados del recuento de espermatozoides del hemocitómetro ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.01$ ), indicando que este método es una herramienta útil para determinar la concentración espermática en conejos, pero pese a las ventajas que muestra el método no es muy utilizada en los centros de IA.

La valoración de la concentración espermática es de vital importancia, ya que el número de espermatozoides inseminados juega un papel importante en la tasa de fertilidad obtenida después de la inseminación artificial y esta determinará el número de dosis de semen resultante para la inseminación artificial (Castellini et al., 2007). Se ha estudiado la relación entre la concentración y la fertilidad para determinar el número mínimo de espermatozoides ( $4 \times 10^6$  de spz/dosis) que han de ser inseminados para conseguir una fertilidad aceptable en conejos (Viudes-de-Castro y Vicente, 1997).

### **1.2.3. Característica de la calidad espermática**

La evaluación de los parámetros de calidad espermática es un procedimiento indispensable que tiene que ser incluido en el espermiograma clásico utilizados en los centros de IA, ya que estos parámetros nos aproximan aún más a predecir la capacidad fecundante del espermatozoide y por lo tanto del macho (Lavara et al., 2013; Quintero-Moreno, 2003).

#### **1.2.3.1. Motilidad**

La motilidad es una condición indispensable para que las células espermáticas sean capaces de atravesar el moco cervical y llegar al sitio de fecundación, siendo finalmente necesaria la presencia de movimientos vigorosos del flagelo para que el espermatozoide pueda penetrar en la zona pelúcida del ovocito, de ahí que la motilidad sea una de las características más importantes para determinar la calidad del esperma (Brugo Olmedo et al., 1995). Los espermatozoides de los mamíferos constan básicamente de dos partes con distintas funciones (cabeza y cola). La cabeza contiene el material genético (ADN) y el acrosoma, que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza. La cola a su vez se divide en tres segmentos: la parte intermedia, principal y terminal. Este es el mecanismo cinético del espermatozoide, debido a que la pieza intermedia y la parte principal de la cola, contienen una serie de elementos semirrígidos cuya función es la de otorgar flexibilidad, dirección y la energía necesaria para el movimiento (Mortimer, 2000). La motilidad de los espermatozoides está ligada al metabolismo energético y la capacidad de movilización de las reservas

energéticas. Por ello, la valoración del semen ha de ser efectuado lo más rápido posible tras su recuperación, teniendo en cuenta de que todo el material usado debe de estar en condiciones de normocinesis (temperatura de 37°C).

Se puede hacer una valoración de la motilidad masal (subjetivo) e individual (objetivo). La motilidad masal se determina depositando una gota de muestra seminal sin diluir sobre un portaobjetos atemperado y visualizado en un microscopio óptico. Evaluando de forma subjetiva el movimiento de las células espermáticas en su conjunto, dando una valoración de 0 a 5, siendo solamente utilizados para inseminación aquellos que presenten una motilidad masal buena (4) o muy buena (5). En el caso de la motilidad individual se calcula el porcentaje de espermatozoides (previamente diluido) con movimientos rectilíneos y progresivos, descartando aquellos con movimientos circulares o nulos. Varias técnicas han sido desarrolladas para valorar la motilidad individual. Los sistemas conocidos como analizadores de semen asistido por ordenador (CASA) han sido desarrollados utilizando análisis automático de imágenes digitales. Además incluyen nuevos parámetros cinéticos del movimiento espermático (ver tabla 3). De esta manera se reduce la variabilidad del efecto humano en las estimas del porcentaje de los espermatozoides móviles y se predice mejor su capacidad fecundante (Mortimer, 2000). Los resultados finales de los sistema CASA dependen de distintos factores como: la temperatura del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada en la medición, el tiempo entre la recogida y el análisis, la concentración espermática, el diluyente utilizado, el objetivo y la iluminación del microscopio, el área de las partículas analizadas y valores propios de ajuste del sistema CASA (Verstegen et al., 2002).

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de motilidad espermática (adaptado de Quintero-Moreno, 2003).

Parámetro	Unidad	Descripción
<b>Según el tipo de motilidad del espermatozoide</b>		
Estáticos	%	Son todos los espermatozoides que no muestran movimiento alguno
Móviles no progresivos	%	Son todos los espermatozoides que muestran movimiento pero no es progresivo
Móviles progresivos	%	Son todos los espermatozoides que muestran movimiento progresivo
<b>Velocidades</b>		
Velocidad Curvilínea (VCL)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo
Velocidad Rectilínea (VSL)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide del primer punto al último punto de su trayectoria
Velocidad Media (VAP)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media
<b>Ratios</b>		
Índice de Linealidad (LIN)	%	Relación porcentual $LIN = VSL/VCL * 100$
Índice de Rectitud (STR)	%	Relación porcentual $STR = VSL/VAP * 100$
Índice de Oscilación (WOB)	%	Relación porcentual $WOB = VAP/VCL * 100$
<b>Otros parámetros</b>		
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH)	μm	Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal
Frecuencia de Batida de la Cabeza (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo

El semen de buena calidad debe presentar más de 75% de espermatozoides móviles y al menos 65% de espermatozoides con movimiento progresivo. Por lo tanto, un análisis pertinente de la motilidad debe centrarse en la obtención de valores normales para los patrones de movimiento. En la tabla 4 se presentan el rango de valores de algunos parámetros cinéticos del espermatozoide, utilizando sistemas CASA. Varios estudios realizados en diferentes especies han demostrado que la evaluación cuantitativa de la cinética del espermatozoide es valiosa para identificar los patrones de motilidad de subpoblaciones de espermatozoides, posiblemente relacionados con diferentes estados de capacitación (Quintero-Moreno et al., 2007).

**Tabla 4.** Características de calidad espermática.

Características	Rango	Referencia
Índice de linealidad LIN (%)	41-59	Quintero-Moreno, (2003); Brun et al., (2006); Ferrian, (2007);
Velocidad promedio VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	36-108	Lavara et al., (2008; 2010; 2012); Safaa et al., (2008); Castellini et al., (2011)
Velocidad curvilínea VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	72-194	Quintero-Moreno, (2003); Roca et al., (2005); García-Tomás et al., (2006a,b)
Viabilidad (%)	70-92	

En semen fresco de conejos, Brun et al., (2002) observaron que la movilidad masal y el número de espermatozoides móviles por dosis de inseminación son los parámetros que más influyen sobre la fertilidad al parto. Por otro lado, Safaa et al., (2008) observan algunas correlaciones entre viabilidad (HOST) y el índice de linealidad (LIN), la concentración y los parámetros cinéticos como velocidad curvilínea, rectilínea y media (VCL, VSL y VAP).

La relación entre la cinética de la motilidad espermática y la fertilidad es poco clara, la diferencia en los instrumentos de CASA utilizado, su configuración y las diferentes relaciones de dilución del espermatozoide han hecho que sea imposible llegar a un acuerdo consensuado (Lavara, 2013).

#### 1.2.3.2. Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide

La prueba de viabilidad se utiliza para determinar la presencia de espermatozoides vivos, diferenciándolos de los muertos (rango de valores ver Tabla 4). Dentro de las pruebas de la viabilidad se incluyen la evaluación de la integridad de la membrana plasmática, los test de endosmosis y test de resistencia térmica. La evaluación de la viabilidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, debido a que la membrana del espermatozoide juega un papel importante durante todos el proceso de la fecundación (durante la capacitación, reacción acrosómica y unión del espermatozoide a la superficie del óvulo), por ello es importante que esté intacta y funcionalmente activa y puede ser un indicador útil de la capacidad fecundante de espermatozoide (Jeyendra et al., 1984).



Dicho análisis se realiza mediante el uso de tinciones, que son evaluados en microscopio de campo claro o fluorocromos combinados que requerirá el uso de microscopio de fluorescencia. Dentro de la combinación de fluorocromos, uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto, permite identificar la células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar todas las membranas y por tanto permite identificar la población de células viables. La combinación más común de fluorocromos utilizados para las evaluaciones de integridad de la membrana es el SYBR-14 y el Ioduro de Propidio (PI). En esta doble tinción, el ADN de espermatozoides viables emiten fluorescencia verde, mientras que aquellos con membrana plasmática dañada (muerta) emite fluorescencia roja. Este procedimiento ha sido aplicado con éxito en diferentes especies de ganado y también en el conejo (Garner y Johnson, 1995).

### 1.2.3.3. Morfología espermática

Además de poseer una motilidad, concentración y viabilidad aceptable, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. La morfología de los espermatozoides refleja la salud de los túbulos seminíferos y en cierto grado del epidídimo. La morfología aceptable donde la fertilidad no se ve afectada es alrededor del 20% a 25% de anomalías o que más del 70% de los espermatozoides posean morfología normal. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides pueden ser primarias (debido a fallas en la espermatogénesis); Secundarias (ocurren durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo) y Terciaria (se produce durante la eyaculación, después de esta y por el manejo inadecuado de la muestra).

Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen (rango de valores ver tabla 5). Por ejemplo, si una dosis seminal tiene una motilidad espermática entorno al 50%, y contiene un 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales, la alta incidencia de esta morfoanomalía repercutirá negativamente en la fertilidad de esa muestra, pese a la buena motilidad del eyaculado. Este defecto es muy común en sementales jóvenes y normalmente su incidencia va disminuyendo a medida que crece y maduran sus órganos sexuales.

**Tabla 5.** Características de morfología y morfometría espermática en conejo de la línea R.

Características		Rango	Referencia
ANR (%)	Espermatozoides anormales	4.0 - 23.5	Vicente et al., (2000); Quintero-Moreno, (2003); Ferrian, (2007);
NAR (%)	Integridad acrosómica	75.2 – 93.2	Safaa et al., (2008); Lavara et al., (2008; 2010; 2012)
L (µm)	Longitud de la cabeza	8.3 - 8.5	
W (µm)	Ancho de la cabeza	4.5 - 4.7	Lavara et al., (2008);
A (µm <sup>2</sup> )	Área de la cabeza	31.3 - 31.9	Marco-Jiménez et al., (2010)
P (µm)	Perímetro de la cabeza	22.5 - 23.9	

La valoración del número de espermatozoides anómalos en un espermiograma cotidiano se debe de realizar de las morfoanomalías más frecuentes y fácilmente observables como: cabezas sueltas, colas enrolladas, gota citoplasmática proximal, macrocéfalos, microcéfalos, doble cabeza y doble cola. Se pueden evaluar en muestras fijadas (con glutaraldehído o formaldehído) mediante microscopio de contraste de fases positivo o de contraste diferencial de interferencia.

#### 1.2.3.4. Morfometría espermática

La morfometría es un análisis objetivo de la morfología de la cabeza del espermatozoide y puede abarcar a la pieza intermedia del esperma, en la que se utilizan programas informáticos como el CASA. Estos sistemas computarizados permiten estimar variaciones en la forma del espermatozoide (cabeza), derivando una serie de nuevos parámetros que se muestra en la tabla 6.

Sin embargo de forma similar a los parámetros que se evalúa con el equipo CASA en motilidad, es necesario establecer los protocolos y condiciones óptimas de evaluación de las muestras (como tipo de tinción utilizado), así disminuir las variaciones de los resultados obtenidos.

**Tabla 6.** Parámetros de morfometría espermática.

Cabeza	Pieza intermedia (P.I)	Forma de la cabeza/fórmula
Longitud (L) ( $\mu\text{m}$ )	Nivel De Gris (%)	Elipticidad $L/W$
Ancho (W) ( $\mu\text{m}$ )	Anchura de la P.I	Rugosidad $4\pi A/P^2$
Área (A) ( $\mu\text{m}^2$ )	Área De la P.I	Elongación $(L-W)/(L+W)$
Perímetro (P) ( $\mu\text{m}$ )	Distancia de inserción de la P.I.	Regularidad $\pi LW/4a$
% de Acrosoma	Ángulo de Inserción de la P.I	

En lo que respecta a la especie cunícola, dado que las variables morfométricas presentan una repetibilidad elevada y un bajo coeficiente de variación (Lavara et al., 2008), hay trabajos que han tratado de relacionar los parámetros morfométricos con los parámetros de motilidad espermática obtenidos por el sistema CASA (Lavara et al., 2008; Safaa et al., 2008), o con la fertilidad de los machos (Marco-Jiménez et al., 2010), como etapa previa a su futura inclusión en el espermiograma clásico para una mejor predicción del potencial de fertilidad. Sin embargo la morfometría espermática tiene un bajo potencial para predecir la fertilidad y prolificidad cuando los eyaculado cumplen requisitos mínimos de uso común en la IA (Marco-Jiménez et al., 2010).

#### 1.2.3.5. Estado del acrosoma

La reacción del acrosoma es un proceso de exocitosis que se produce después de la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida. Para fertilizar el ovocito, tanto la capacitación y la reacción acrosómica de los espermatozoides son necesarios, pero la ubicación y la correcta sincronización de la ocurrencia son también muy importantes. La capacitación prematura o reacción acrosómica provoca la pérdida de la capacidad fecundante de los espermatozoides (International Rabbit Reproduction Group, 2005).

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación, por lo tanto conviene realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tiene el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal (con su borde apical), la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosoma alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja. Para determinar el estado del acrosoma se puede utilizar tinciones. Sin embargo, la manera más rápida de determinar el estado del acrosoma en aquellas especies donde el espermatozoide es lo suficientemente grande, es fijar la muestra en una solución de glutaraldehído y observar de forma directa la estructura acrosomal en un microscopio con contraste de fases. Con este sistema distinguimos un borde apical nítido que corresponde a un espermatozoide con acrosoma sin reacción o borde apical normal (NAR), si a la observación el borde apical no se distingue o se visualiza borroso, corresponde a un espermatozoide con acrosoma reaccionado o borde apical dañado (DAR). Ver el rango de valores en la tabla 5.

## **2. OBJETIVO**

En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la selección por ganancia media diaria desde el destete (día 28) hasta la edad del sacrificio en España (día 63), sobre la calidad espermática en una línea paterna de conejo. Para ellos se emplearon animales separados por 18 generaciones de selección, sobre las que se compararon las características seminales, así como la fertilidad y prolificidad.

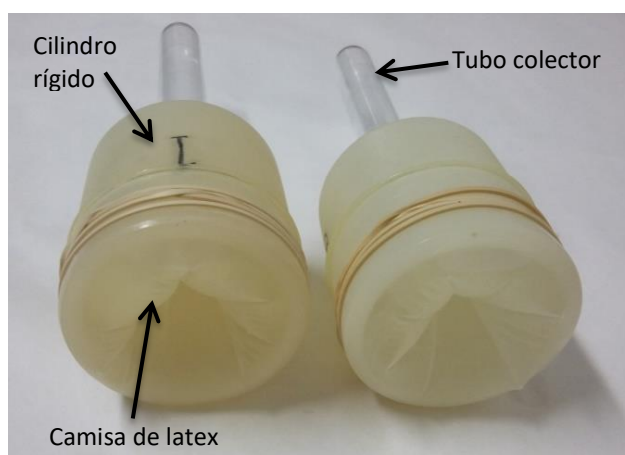
### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales

Todos los animales utilizados pertenecían a la línea R, línea paternal seleccionado por velocidad de crecimiento desde el destete hasta la edad de sacrificio (28 días a 63 días) desde el año 1992 por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (Estany et al., 1992). Se utilizaron un total de 24 machos de 6 meses de edad, de los cuales se analizaron 183 eyaculados. Los machos se agruparon en dos grupos experimentales: machos de la generación 18 (n=8) y de la generación 36 (n=16). Estos machos fueron obtenidos a partir del banco de embriones de la Universidad Politécnica de Valencia y de un proyecto actualmente en marcha, donde se ha reconstituido las generaciones 18 y 36 de la línea R.

#### 3.2. Recuperación de eyaculados

La recuperación de las muestras de semen se realizó con el método de la vagina artificial. La vagina artificial es un dispositivo que simula las condiciones del tracto reproductor de la hembra, proporcionándole al pene los estímulos de presión y temperatura necesarios para la eyaculación. Brevemente, la vagina artificial consta de un cuerpo rígido, un revestimiento interno o camisa y un tubo colector (figura 2). El cuerpo es un cilindro con dos aberturas terminales. En una de ellas se sitúa un tubo colector, mientras que la otra permite la introducción del pene del conejo y la eyaculación. Este cilindro dispone de un orificio que permite el suministro de agua caliente. La camisa es otro cilindro de látex más largo que el cuerpo, de forma que, una vez introducido en él, se puedan revertir los bordes. De este modo se forma una cavidad cerrada entre el cuerpo y la camisa destinada a contener agua caliente. El colector es un tubo estéril de diámetro ajustado a la abertura más estrecha del cuerpo. Para la colección, la vagina se mantiene a 50°C para estimular la eyaculación y evitar que la muestra obtenida contuviese orina, puesto que una temperatura inferior estimula la micción. Una vez obtenidas las muestras estas fueron transportadas al laboratorio protegidas de la luz y de cambios de temperatura. La dinámica de recuperación empleada fue de 2 eyaculados a la semana, recuperados el mismo día con un intervalo de tiempo entre las recuperaciones de 30 minutos.



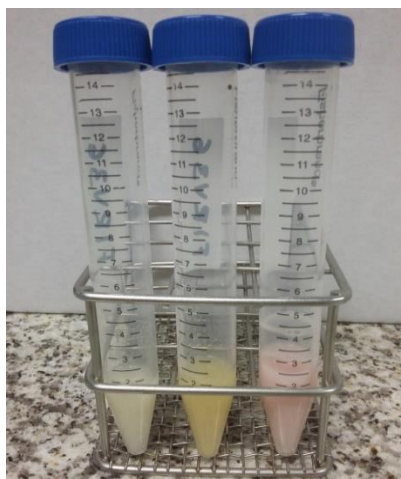
**Figura 2.** Vagina artificial armada.

### 3.3. Evaluación de las características seminales

La valoración de los eyaculados se realizó en un primer momento de forma macroscópica, descartando aquellos eyaculados contaminados (heces, orina y sangre) y determinando el volumen. Microscópicamente se realizó la valoración de las muestras, por un lado sobre muestras frescas como motilidad y viabilidad espermática, y por otro lado sobre muestras fijadas previamente con glutaraldehído (0.5%), como la concentración, valoración de morfoanomalías y del borde apical del espermatozoide (estado acrosomal).

#### 3.3.1.1. Valoraciones macroscópicas

En cada tanda de recuperación se realizó inmediatamente una evaluación inicial. Esta valoración se realizó de acuerdo a la recomendación del International Rabbit Reproduction Group, (2005), que indican que una muestra de semen normal de conejo tiene un aspecto blanco opalescente homogéneo, sin presencia de células rojas de sangre (rojizo), orina (amarillo), precipitaciones de carbonato o muestras de semen anormales, que generalmente se desecharon al momento de evaluarlos (figura 3). Aquellas muestras que presentaron “el tapón de gel” fueron evaluados tras su eliminación.



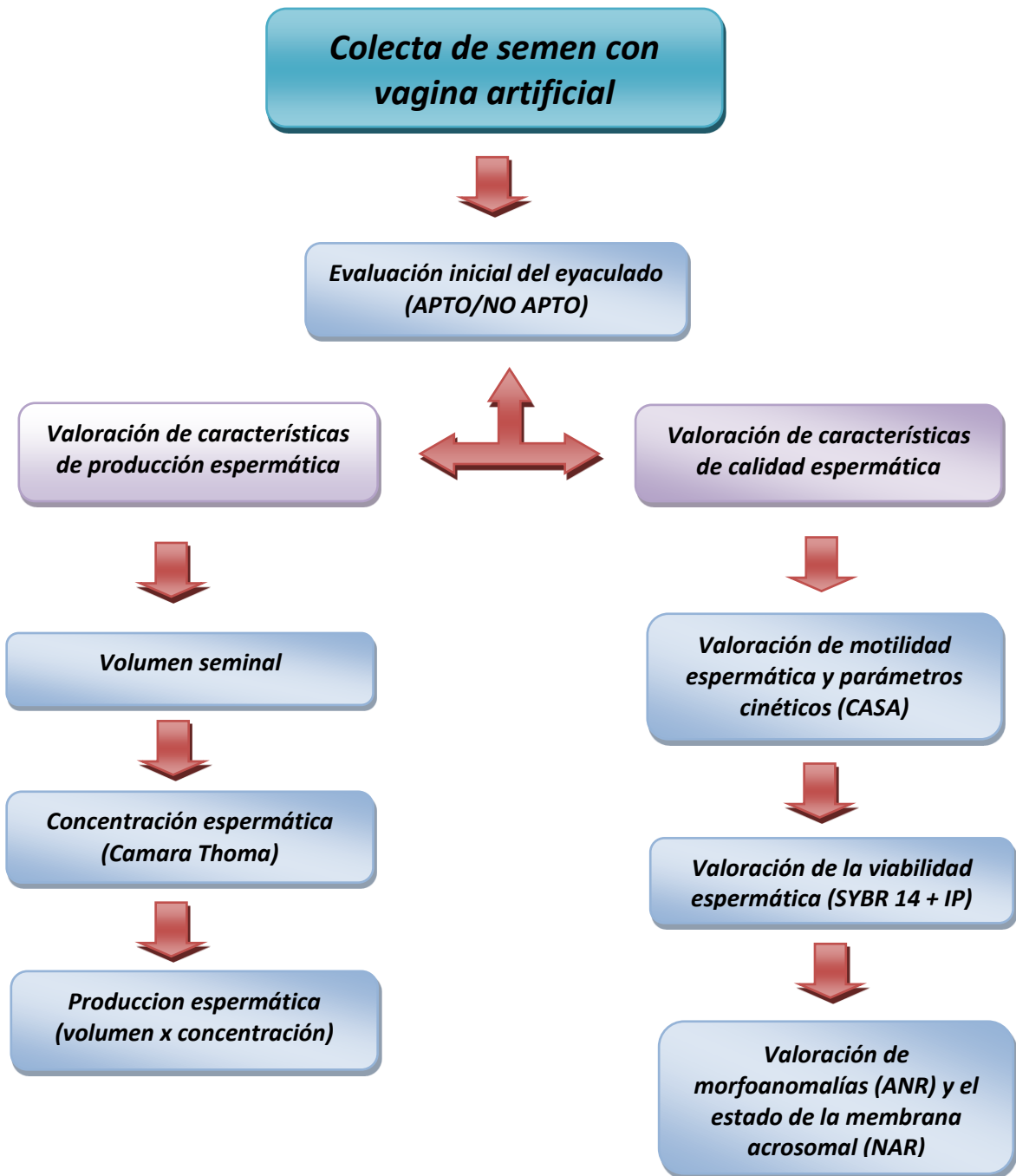
**Figura 3.** Muestra de semen apto (izquierda) y no apto: orina (centro) y sangre (derecha).

Con las muestras de semen en el laboratorio se midió el volumen de cada eyaculado individualmente con la ayuda de una pipeta pasteur y se procedió a formar el pool de los dos eyaculados obtenidos por cada macho. Posteriormente se procedió a tomar alícuotas para el análisis de los parámetros con muestras frescas (motilidad y viabilidad) y con muestras fijadas (concentración, morfoanomalías y reacción acrosómica).

#### 3.3.1.2. Valoraciones microscópicas

Tras la valoración macroscópica de las muestras de cada macho, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l que fue diluida (1:20) con un diluyente Tris-Cítrico-Glucosa, para valorar la motilidad y la viabilidad, y otra alícuota de 20  $\mu$ l (1:20) que fue fijada con glutaraldehído al 0,5% (v/v) para evaluar la concentración, las morfoanomalías y el estado de la membrana acrosomal.

**Figura 4.** Flujograma resumen de la evaluación seminal



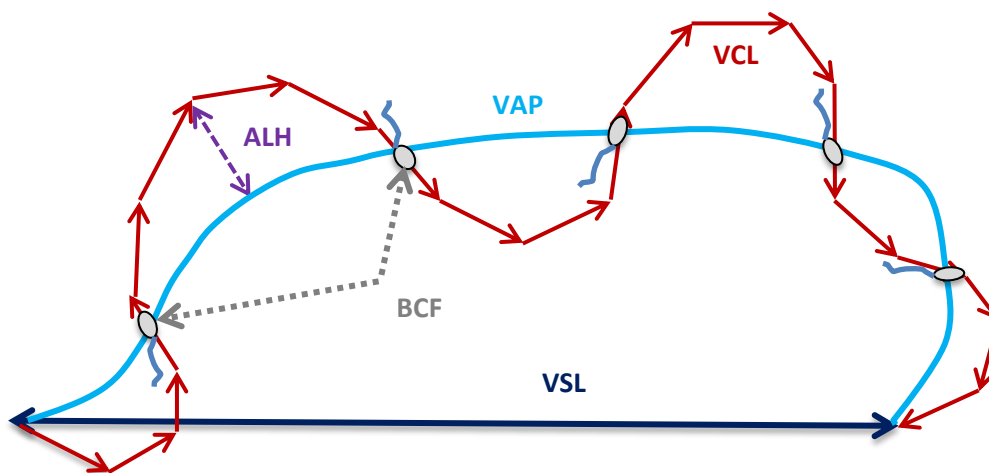
### 3.3.1.3. Motilidad

Para caracterizar la motilidad se usó un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España), una cámara Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel, ver figura 5) y el Sistema Integrado de Análisis Espermático (ISAS) CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer), que permite una evaluación objetiva de la motilidad espermática y que proporciona información de la cinética individual del espermatozoide (Sperm Vision™; MiniTube, Tiefenbach, Alemania).



**Figura 5.** Cámara Makler para la evaluación de motilidad espermática.

Antes de realizar la evaluación de la motilidad objetiva (CASA), se procedió a valorar la motilidad subjetiva, dándole una valoración de 0 a 100 a las muestras de semen, observadas en el microscopio a un aumento de 100x. Para evaluar la motilidad objetiva con el CASA, se tomó 10 µl de la alícuota de semen diluido (1:20) y se depositó en la cámara Makler (platina atemperada a 37°C). Con un aumento de 100x se tomaron 5 vídeos (25 imágenes por segundo) para registrar, al menos, 200 espermatozoides de las muestras de cada muestra. Con el módulo de Motilidad del CASA se evaluó automáticamente parámetros de motilidad espermática como espermatozoides móviles progresivos y parámetros cinéticos de la motilidad espermática (ver figura 6) como: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batida de la cabeza (BCF).



**Figura 6.** Parámetros cinéticos de motilidad obtenidos por el sistema CASA.

Antes de realizar las capturas de imágenes (Frame) para evaluar los parámetros cinéticos de la motilidad espermática, el equipo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se configuró de acuerdo a la recomendación para la evaluación del semen de conejo como se muestra en la tabla 7.

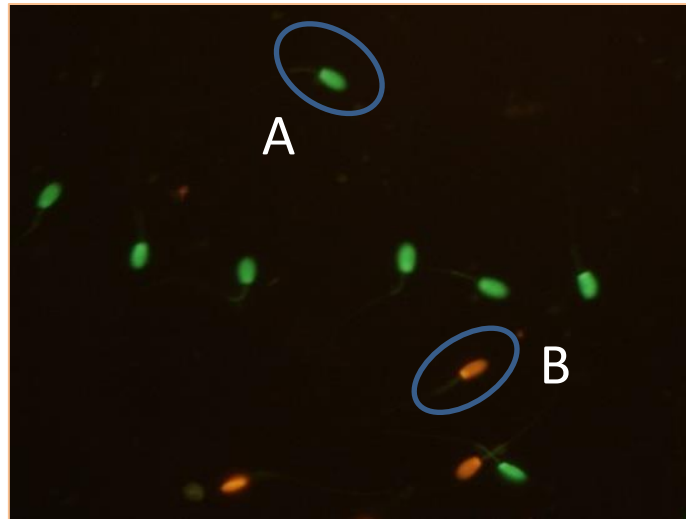
**Tabla 7.** Configuración del CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

Características de ajuste	Valores de ajuste
Área de partículas ( $\mu\text{m}^2$ )	30 – 60
Lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	>10 y <25 de VCL y VAP
Medios ( $\mu\text{m/s}$ )	>25 y <50 de VCL y VAP
Rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )	>50 de VCL y VAP
Progresivo (%)	70 % de su STR
Conectividad (puntos)	13
Número mínimo de puntos para calcular ALH	10
Frame/segundos	25

### 3.3.1.4. Viabilidad

Este análisis se realizó haciendo uso de un kit de viabilidad espermática (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, Eugene, Oregon, USA) que contiene SYBR-14 e Ioduro de Propidio (IP) como marcadores fluorescentes. Concretamente, SYBR-14 es un compuesto permeable a la membrana celular que se une al ADN presente en el núcleo, emitiendo fluorescencia de color verde siempre y cuando el citoplasma mantenga su actividad acetilasa y actúe sobre el fluorocromo, lo que ocurre si la membrana citoplasmática está intacta. En cambio, el IP no es permeable a la membrana plasmática, por lo que únicamente será capaz de teñir aquellas células que presenten daños en la misma al intercalarse en su ADN. De esta forma pueden observarse dos poblaciones diferenciadas, espermatozoides con membrana citoplasmática intacta (viables, coloración verde) y los que muestran daños en la membrana citoplasmática (no-viables, coloración roja), ver figura 7.





**Figura 7.** Imagen tomada a 400x. Con el filtro B-2A se observan las células viables (A) y con el filtro G-2A se observan las células no-viables (B).

Se siguió el protocolo de tinción descrito por el fabricante, donde se añadió 2.5 µL de SYBR-14 (previamente diluido 1:100 con DMSO) y 2.5 µL de Ioduro de Propidio (IP; diluido 1:100 con TCG) a 400 µL de semen diluido (1:20) en TCG-BSA. Tras esto se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de su valoración y finalmente se fijó la muestra incubada con 100 µL de glutaraldehído al 0.5%.

Durante todo este proceso y su posterior observación se trabajó en oscuridad para así evitar la pérdida de intensidad de la fluorescencia. Fue necesario el uso de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) observando a 400x. Para la evaluación se utilizaron diferentes filtros. Se empleó el filtro G-2A con una longitud de onda de excitación de 510-560 nm y emisión a 575-590 nm, para hacer visibles las células dañadas teñidas con IP (rojo) y el filtro B-2A con una longitud de onda de excitación de 450-490 nm y emisión a 505-520 nm para observar, con fluorescencia verde, las células viables teñidas con SYBR-14 (figura 6). Se realizó un recuento en distintos campos hasta obtener un total de 100 - 150 espermatozoides para obtener datos representativos de la muestra y con ellos se calculó el porcentaje de viabilidad de la siguiente manera:

$$V = \frac{V}{(V + M)} * 100$$

### 3.3.1.5. Concentración

Con la alícuota diluida (1:20) y fijada con glutaraldehído, se realizó la determinación de la concentración. Para ello se utilizó contraste de fases en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) a un aumento de 400x. Se empleó una cámara Thoma glóbulo Zeiss (Marienfeld, Alemania) cuantificando el número de espermatozoides en base a las indicaciones del fabricante (recuento de células de espermatozoides en 40 cuadrados de 0.025 mm y altura de 0.1mm). Previamente a la realización del conteo, se dejó la muestra 2 minutos en reposo una vez colocada en la cámara, para que así todos los espermatozoides se situasen en el mismo plano de visión.

### 3.3.1.6. Morfología y evaluación del estado acrosomal

Mediante el análisis morfológico del espermatozoide se determinó el porcentaje de espermatozoides anormales, el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática y el porcentaje de espermatozoides con estado acrosomal intacto. Con el fin de determinar el estado acrosomal se utilizó la mezcla diluida 1:20 en glutaraldehído 0.5%, la cual se observó mediante microscopía de contraste de fases negativa con un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) a un aumento de 400x. Se contaron entre 100 - 150 espermatozoides y se determinó el estado del acrosoma intacto (NAR) o dañado (DAR) (ver figura 8) y se calculó de la siguiente manera:

$$NAR = \frac{NAR}{(NAR + DAR)} * 100$$

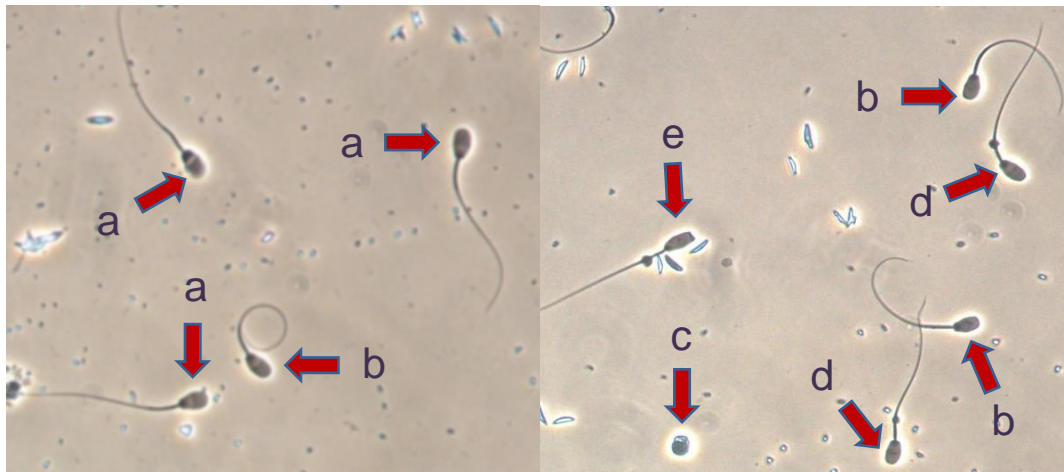


**Figura 8.** Evaluación del estado del acrosoma. (A) Borde apical reaccionado o dañado (DAR); (B) borde apical normal o intacto (NAR). Imagen observada a un aumento de 400x.

Para el análisis morfológico se determinó el porcentaje de espermatozoides anormales (ANR) presentes en la muestra, haciendo uso de la misma preparación y el mismo método de visualización que el empleado en la determinación del estado acrosómico del espermatozoide. Se contabilizaron entre 100 y 150 espermatozoides y se clasificaron en normales, anormales (cabezas sueltas, presencia de dos colas, colas enroscadas, piezas intermedias dobladas y cabezas anormales) y con gota citoplasmática (ver figura 9). Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$ANORMALIDADES = \frac{ESPERMATOZOIDES\ CON\ ANORMALIDADES}{ESPERMATOZOIDES\ CON\ ANORMALIDADES + ESPERMATOZOIDES\ NORMALES} * 100$$

$$PRESENCIA\ GOTA\ CITOPLAMÁTICA = \frac{ESPERMATOZOIDES\ CON\ GOTA}{(ESPERMATOZOIDES\ CON\ GOTA + ESPERMATOZOIDES\ MADUROS)} * 100$$



**Figura 9.** Morfología espermática en conejos: **(a)** forma normal; **(b)** cola enrollada; **(c)** cabeza suelta; **(d)** gota citoplasmática y **(e)** cabeza piriforme. Observadas a un aumento de 400x.

### 3.4. Fertilidad y prolificidad

Por las características intrínsecas de los machos de la línea R (pesada), la gestión reproductiva se llevó a cabo mediante inseminación artificial tal y como se puede ver en la figura 10. Para ello, se recuperaron eyaculados de los machos y se realizaron inseminaciones individuales con todo el eyaculado recuperado (calidad >70% de motilidad y <25% de morfoanomalías) sobre hembras de la misma línea y generación. Previa a la inseminación se realizó la valoración de la receptividad de las hembras (vulva roja). Inmediatamente tras la inseminación se indujo la ovulación inyectando por vía intramuscular 1µg de acetato de buserelina (Suprefact, Sanofi-aventis, S.A, Barcelona, España). Se determinó la fertilidad a palpación (12 días) y al parto. Finalmente se observó la prolificidad determinando el número de gazapos nacidos vivos y nacidos muertos (tamaño de camada).



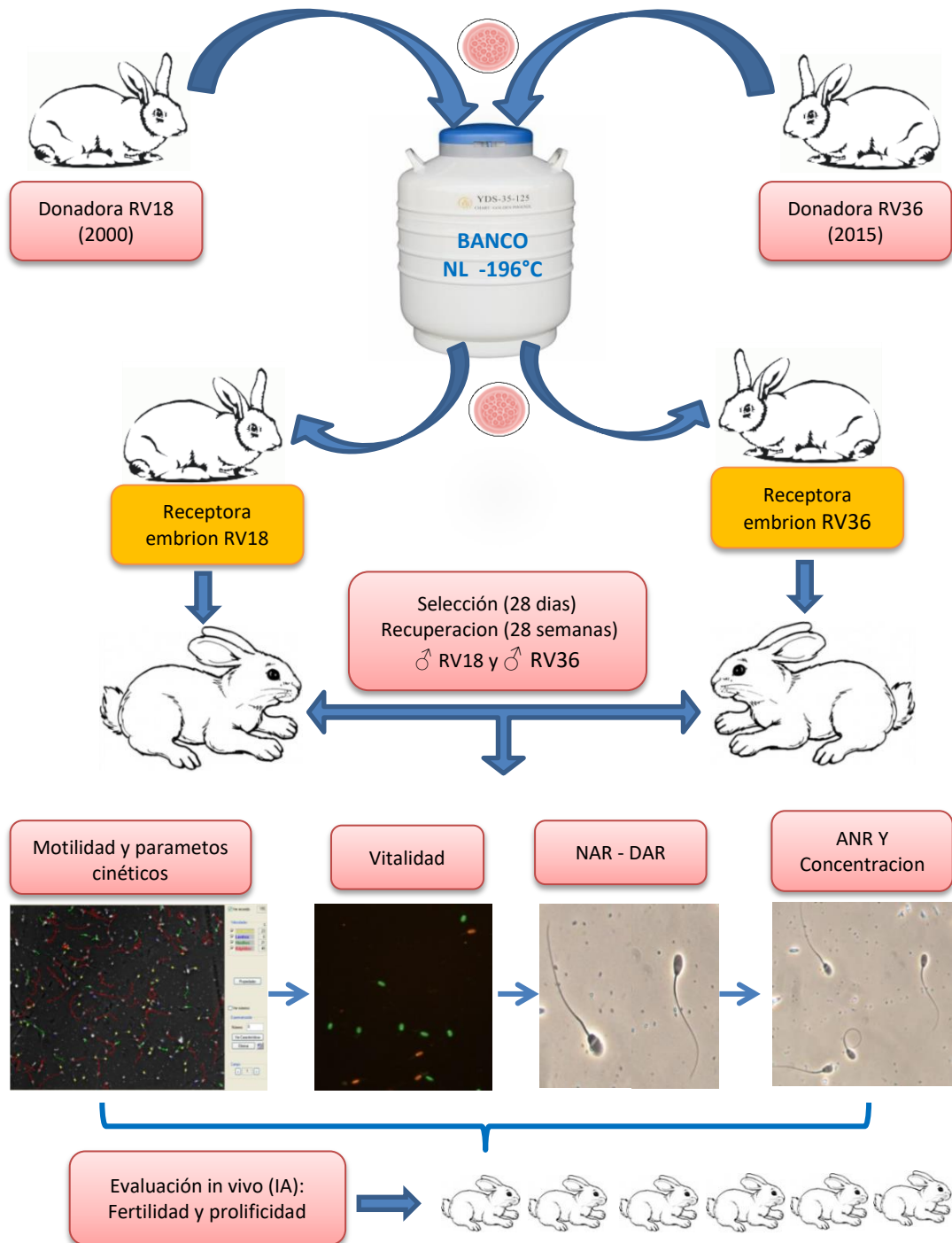
**Figura. 10.** Inseminación artificial de las hembras receptoras.

### 3.5. Diseño experimental

Se tuvo dos grupos experimentales de machos de la línea R. Animales reconstituidos a partir de embriones vitrificados y almacenados en nitrógeno líquido (NL) en el año 2000 (Generación 18) y animales reconstituidos a partir de embriones vitrificados en el año 2015 (Generación 36), los cuales fueron almacenados durante un año hasta su posterior transferencia. Embriones de ambas generaciones fueron descongelados y

transferidos en hembras receptoras de la línea A, de manera que los grupos experimentales fueran coetáneos. Los conejos macho obtenidos de los embriones vitrificados (18 y 36), fueron seleccionados a los 28 días de edad (destete) y alojados en grupos de 7. Posteriormente fueron ubicados en jaulas individuales. Se realizaron evaluaciones de la conducta sexual y el entrenamiento de los machos (líbido, cortejo, aceptación a la vagina artificial, monta y eyaculación) a partir de la semana 20 hasta las 28 semanas de edad. A partir de la semana 28 se empezó la recuperación de semen y valoración de las características del eyaculado que se prolongó durante 8 semanas. Un resumen de diseño experimental se muestra en la figura 11.

**Figura 11.** Esquema del diseño y organización experimental.



Finalmente se realizó la evaluación in vivo de la calidad seminal en hembras inseminadas con semen fresco de los machos en estudio para ambas generaciones. Se evaluaron la tasa de fertilidad (12 días-palpación y al parto) y prolificidad. Para determinar la prolificidad, tras el parto se contabilizó el número de gazapos nacidos vivos y nacidos muertos.

Todos los animales fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones ambientales controladas: temperatura media diaria mínima de 17.5°C y máxima de 25°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y acceso libre a agua y pienso comercial (17.5% de proteína cruda, extracto de éter 3.5%, 16.7% de fibra cruda, 2938 kcal / kg sobre materia seca).

Todos los procedimientos experimentales empleados en este estudio se realizaron de conformidad con la Directiva 2010/63/CEE del Consejo de la UE para los experimentos con animales, y fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación con Animales de la Universidad Politécnica de Valencia, España (código de la investigación: 2015 / VSC / PEA / 00061).

### **3.6. Análisis estadístico.**

Todos los parámetros seminales fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado (GLM) que incluyó como efecto fijo la generación.

La fertilidad a palpación y al parto, fueron analizados por medio de una función binomial probit\_link (SPSS), en la que se utilizó como efecto fijo la generación (18 y 36). Se asignaron valores binomiales a la fertilidad, de modo que las conejas inseminadas que fueron palpadas positiva o que parieron recibían un valor de 1, y aquellas que fueron palpadas negativa o que no parieron, un valor de 0. Para el análisis de la prolificidad se realizó un análisis de la varianza usando un GLM, en el que se incluyó como efecto fijo la generación.

Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002). Se consideraron diferencias estadísticas significativos a valores de  $P < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Estadísticos descriptivos

Los estadísticos descriptivos (media, D.S, CV y rango) de las características de producción y calidad espermática estudiadas se muestran en la tabla 8. En esta se incluyen características de producción espermática (volumen, concentración y producción espermática) y de calidad espermática (viabilidad, motilidad subjetiva, porcentaje de espermatozoides anormales y porcentaje de espermatozoide con el borde apical normal, porcentaje de espermatozoide con presencia de gota citoplasmática).

**Tabla 8.** Estadísticos descriptivos de las características de producción y calidad espermática.

Parámetros seminales	N	Media	D.S	C.V	Min	Max
Volumen (mL)	183	0.8	0.48	0.58	0.2	2.5
Concentración ( $10^6$ SPZ/mL)	181	200.9	137.69	0.69	16.0	630.0
Producción ( $10^6$ SPZ/eyaculado)	181	165.4	143.80	0.87	8.0	909.0
Viabilidad (%)	181	73.2	10.53	0.14	36.6	92.8
ANR (%)	178	19.5	8.92	0.46	0.0	45.7
NAR (%)	178	90.4	6.76	0.71	100.0	67.8
Gota citoplasmática (%)	176	7.4	7.22	0.98	0.0	32.1
MOT Subjetiva (%)	178	78.0	13.84	0.18	30.0	95.0

N: número de datos; D.S: desviación estándar; C.V: coeficiente de variación; ANR (%): porcentaje de espermatozoides anormales; NAR (%): porcentaje de espermatozoide con el borde apical normal; MOT Subjetiva (%): porcentaje de espermatozoides móviles evaluados subjetivamente.

Estas características presentaron coeficientes de variación altos. Las características productivas de semen (volumen, concentración y producción) fueron las que más variabilidad mostraron (0.58, 0.69 y 0.87 respectivamente). De las características de calidad espermática que mostraron mayor variabilidad fueron NAR (espermatozoides con borde apical normal) y ANR (espermatozoides con morfoanomalías) con 0.71 y 0.46 de coeficiente de variación respectivamente.

Los altos valores de variabilidad de las características seminales de producción como: volumen, concentración y producción espermática y de las características de calidad espermática (NAR y ANR), observados en este estudio fueron similares a los obtenidos en varios estudios (Ferrián, 2007; García-Tomás et al., 2006a,b; Lavara et al., 2011, 2012; Tusell et al., 2012).

Los parámetros de motilidad y cinética espermática se muestran en la tabla 9. En las que se incluyen el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT), la motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP); índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de la cabeza del espermatozoide (BCF).

**Tabla 9.** Estadísticos descriptivos de los parámetros cinéticos de motilidad.

Parámetros seminales	N	Media	D.S	C.V	Min	Max
MOT (%)	179	77.4	13.93	0.18	29.5	96.1
MP (%)	183	42.7	15.08	0.35	3.3	73.5
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	183	99.2	23.14	0.23	16.3	156.4
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	183	41.7	13.63	0.33	9.1	79.3
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	183	60.8	17.22	0.28	21.3	96.0
LIN (%)	182	42.5	12.85	0.30	14.7	73.5
STR (%)	182	68.3	9.55	0.14	42.7	86.5
WOB (%)	182	60.9	11.89	0.19	34.3	88.6
ALH ( $\mu\text{m}$ )	183	2.9	0.54	0.19	1.5	4.1
BCF (Hz)	182	10.9	1.60	0.14	5.9	15.3

N: número de datos; D.S: desviación estándar; C.V: coeficiente de variación; MOT (%): porcentaje de espermatozoides móviles; MP (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad curvilínea; VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad rectilínea; VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media; LIN (%): índice de linealidad; STR (%): índice de rectitud; WOB (%): índice de oscilación; ALH ( $\mu\text{m}$ ): amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y BCF (Hz): Frecuencia de Batida de la Cabeza.

Todos los parámetros de cinética de la motilidad espermática mostraron coeficientes de variación por lo general bajos, manteniéndose en un rango de 0.14 a 0.35. Los resultados que se muestran en la tabla 8 y 9 son típicos para el conejo y están dentro del rango de los descritos en otros trabajos previos en estudios de la línea R (Mocé, et al., 2000; Vicente et al., 2000; Viudes-de-Castro, et al., 2005; Ferrian, 2007; Quintero-Moreno et al., 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2008; 2010, 2012).

#### 4.2. Características de producción seminal

Los resultados del volumen del eyaculado obtenidos (0.6-1.0mL) son similares a los observados en trabajos anteriores (Vicente et al., 2000; Ferrian, 2007; Quintero-Moreno et al., 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2008, 2010). No obstante estos son inferiores (1.2-1.6mL) a los descritos por Mocé, et al., (2000) y García-Tomás et al., (2006a,b) y superiores (0.4-0.5mL) a los observados por Brun, et al., (2006, 2016).

En cuanto a la concentración espermática, los resultados observados en este estudio son similares ( $145\text{-}230 \times 10^6$  spz/mL) a estudios previos realizados sobre machos de esta misma línea (Vicente et al., 2000, Ferrian, 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2008; 2010). No obstante estos valores son algo inferiores ( $240\text{-}400 \times 10^6$  spz/mL) a los descritos en otros trabajos previos (Mocé, et al., 2000; García-Tomás et al., 2006a,b; Quintero-Moreno et al., 2007). Respecto a la concentración descrita en otra línea paterna (Brun, et al., 2006, 2016), estos fueron muy altos ( $663\text{-}738 \times 10^6$  spz/mL) en contraposición a los resultados obtenidos en este trabajo.

Dentro de las características de producción seminal evaluadas, se encontró diferencias significativas en el volumen del eyaculado ( $0.7 \pm 0.06$  mL frente a  $0.9 \pm 0.04$  mL) y en la producción ( $122.8 \pm 19.67 \times 10^6$  spz/eyaculado frente a  $184.0 \pm 12.60 \times 10^6$  spz/eyaculado) entre la generación 18 y la generación 36 respectivamente. No obstante, la concentración espermática no se vio alterada, mostrando para ambas generaciones, los valores medios se pueden visualizar en la tabla 10.

**Tabla 10.** Características de cantidad espermática (*lsm*  $\pm$  e.s).

Generación	Volumen (mL)	Concentración ( $10^6$ spz/ml)	Producción ( $10^6$ spz/eyaculado)
18	$0.7 \pm 0.06^b$	$199.5 \pm 18.62$	$122.8 \pm 19.67^b$
36	$0.9 \pm 0.04^a$	$201.5 \pm 12.30$	$184.0 \pm 12.60^a$

<sup>a,b</sup> Letras distintas en la misma columna muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Las diferencias observadas en volumen tras 18 generaciones de selección, podría ser debido al efecto de la selección por velocidad de crecimiento, ya que la respuesta obtenida por generación es aproximadamente de 0,4-0,6 g/d, desde el destete hasta el engorde, lo que conlleva como principales consecuencias una mejora del índice de conversión y un aumento del tamaño adulto (Blasco et al., 2003) haciendo a los machos de la generación actual (36) más pesados. Por lo tanto presentarán mayor tamaño y volumen testicular frente a sus coetáneos de la generación 18, lo que podría explicar una mayor producción en volumen seminal, además influyendo directamente en el aumento de la producción espermática (volumen x concentración).

Varios autores han correlacionado el volumen del eyaculado con la GMD. En concreto Lavara et al., (2011) determinaron una correlación genética moderada positiva ( $0.36 \pm 0.34$ ) entre el volumen del eyaculado y la GMD. Por lo tanto los resultados del presente trabajo son coadyuvados por la correlación genética observada en conejos de la línea R. Además Brun et al., (2006) determinaron correlaciones positivas ( $r = 0.39$  y  $0.59$  liviana y pesada respectivamente) entre el peso testicular y el peso vivo en una línea de conejo seleccionados divergentemente a los 63 días de peso corporal.

Estudios previos (Ródenas et al., 2008; Tusell et al., 2012) concluyen que la selección por GMD después de varias generaciones de selección no debería tener efectos sobre la concentración, Volumen y Producción espermática. Resultados contradictorios a los obtenidos en este estudio.

### 4.3. Parámetros de calidad espermática

Las características espermáticas: viabilidad, morfoanomalías (ANR) y el estado del borde apical normal (NAR), evaluadas en este trabajo no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los machos de ambas generaciones. Sin embargo la motilidad subjetiva ( $74.9 \pm 1.85\%$  frente a  $79.4 \pm 1.24\%$ ) y el porcentaje de espermatozoides con presencia de gota citoplasmática ( $10.1 \pm 0.99$  frente a  $6.3 \pm 0.63$ ) mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las generaciones 18 y 36 respectivamente (ver tabla 11).



**Tabla 11.** Características de calidad espermática (*lsm ± e.s.*).

Gen	MOT SUBJ (%)	VIABILIDAD (%)	ANR (%)	NAR (%)	GOTA (%)
18	74.9 ± 1.85 <sup>b</sup>	71.2 ± 1.41	17.9 ± 1.21	89.9 ± 0.93	10.1 ± 0.99 <sup>a</sup>
36	79.4 ± 1.24 <sup>a</sup>	74.1 ± 0.93	20.0 ± 1.80	90.6 ± 0.61	6.3 ± 0.63 <sup>b</sup>

MOT SUBJ (%): motilidad subjetiva; ANR (%): porcentaje de espermatozoides anormales; NAR (%): porcentaje de espermatozoide con el borde apical normal; GOTA (%): porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática. <sup>ab</sup> Letras distintas en las columnas muestran diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ).

Estas diferencias observadas son poco relevantes, ya que los valores obtenidos están dentro de los recomendados (<70 % de motilidad espermática y >15% de gota citoplasmática).

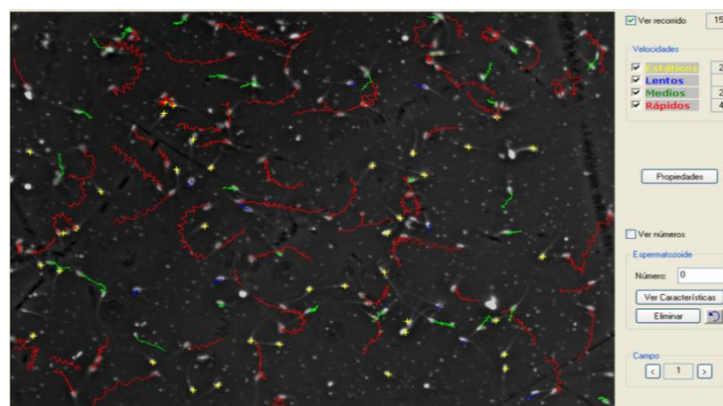
Los resultados de viabilidad mostrados en la tabla 11 fueron superiores a los observados por Safaa et al., (2008) e inferiores a los obtenidos por García-Tomás et al., (2006a,b) y Quintero-Moreno et al., (2007). Son pocos los estudios en conejo donde se evalúa la viabilidad espermática. Las diferencias en los resultados obtenidos frente a otros estudios podrían ser debido a los tipos de línea genética de conejos evaluados y a los diferentes protocolos usados en la evaluación de la viabilidad espermática, como el HOST test (Safaa et al., 2008) y la tinción de eosina y negrosina (García-Tomás et al., 2006a, 2006b; Quintero-Moreno et al., 2007).

Con respecto al porcentaje de espermatozoides con morfoanomalías, los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los descritos en trabajos previos (García-Tomás et al., 2006a,b; Quintero-Moreno et al., 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2010, 2012), aunque algo superiores a los descritos en otros trabajos (Mocé et al., 2000; Vicente et al., 2000; Ferrián, 2007; Lavara et al., 2008). Asimismo, los valores obtenidos para el porcentaje de espermatozoides con estado acrosomal normal o con borde apical normal fueron similares a los valores obtenidos en trabajos previos realizados en conejos de la línea R (Mocé et al., 2000; Vicente et al., 2000; Viudes-de-Castro et al., 2005; García-Tomás et al., 2006a,b; Quintero-Moreno et al., 2007; Ferrián, 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2008, 2010, 2012).

Lavara et al., (2012) describen heredabilidades ( $h^2$ ) generalmente bajas para las características de calidad espermática y los parámetros cinéticos de motilidad. Estos autores determinaron una correlación genética negativa entre la GMD y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto y la motilidad (-0.40 y -0.53 respectivamente). Nuestros resultados indican que la selección por GMD parece no tener efectos sobre las características de calidad espermática del porcentaje de espermatozoides con morfoanomalías, porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto y la viabilidad.

#### 4.4. Parámetros cinéticos de la motilidad espermática

Los parámetros cinéticos determinados mediante el software CASA se muestran en la figura 12. Dentro de los parámetros cinéticos se incluye el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT), el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (MP), Velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y la velocidad media (VAP) determinadas a partir del movimiento.



**Figura 12.** Imagen de las trayectorias cinéticas del espermatozoide analizadas por el CASA.

Los parámetros cinéticos de la motilidad espermática no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ , tabla 12). A excepción de la velocidad curvilínea que mostró una menor velocidad en los espermatozoides de la generación 18 frente a 36 ( $92.4 \pm 3.04 \mu\text{m/s}$  frente a  $102.2 \pm 2.02 \mu\text{m/s}$  respectivamente), esta diferencia observada parece indicar que los espermatozoides de los machos de la generación 36 presenta ligeramente una trayectoria más sinuoso, sugiriendo la presencia de espermatozoides hiperactivados que describirían un movimiento de trayectoria circular.

**Tabla 12.** Parámetros cinéticos de la motilidad espermática ( $lsm \pm e.s$ ).

Gen	MOT (%)	MP (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )
18	$75.4 \pm 1.87$	$44.1 \pm 2.02$	$92.4 \pm 3.04^b$	$42.6 \pm 1.82$	$58.8 \pm 2.30$
36	$78.3 \pm 1.25$	$42.0 \pm 1.34$	$102.2 \pm 2.02^a$	$41.3 \pm 1.21$	$61.7 \pm 1.53$

MOT (%): porcentaje de espermatozoides móviles; MP (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): Velocidad curvilínea; VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad rectilínea; VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media. <sup>ab</sup> Letras distintas en las columnas muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Varios autores en trabajos previos documentaron resultados similares sobre los parámetros cinéticos, a excepción de la velocidad curvilínea que son algo inferiores a los reportes obtenidos en este trabajo (Viudes-de-Castro et al., 2005; Quintero-Moreno et al., 2007; Ferrián, 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2008, 2010, 2012).

En la tabla 13 se muestran los parámetros de los ratios cinéticos: índice de linealidad (LIN); índice de rectitud (STR); índice de oscilación (WOB) y los parámetros cinéticos complementarios: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batida de la cabeza del (BCF). De todos ellos, únicamente el índice de oscilación no mostró diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Por lo tanto, el índice de linealidad y de rectitud mostraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ). Los espermatozoides de los machos de la generación 18 mostraron unos niveles superiores a los de la 36 ( $46.6\pm 1.68\%$  frente a  $40.6\pm 1.12\%$  y  $72.2\pm 1.24\%$  frente a  $66.5\pm 0.82\%$  para LIN y STR respectivamente). Sin embargo los espermatozoides de los machos de la generación 36 mostraron unos valores superiores para los parámetros ALH Y BCF ( $2.7\pm 0.07\mu\text{m}$  frente a  $2.9\pm 0.05\mu\text{m}$  y  $10.5 \pm 0.21\text{Hz}$  frente a  $11.1 \pm 0.14\text{Hz}$  respectivamente).

**Tabla 13.** Ratios de los parámetros cinéticos de la motilidad espermática (*ism ± e.s.*).

Gen	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)
18	$46.6 \pm 1.68^a$	$72.2 \pm 1.24^a$	$63.5 \pm 1.58$	$2.7 \pm 0.07^b$	$10.5 \pm 0.21^b$
36	$40.6 \pm 1.12^b$	$66.5 \pm 0.82^b$	$59.9 \pm 1.05$	$2.9 \pm 0.05^a$	$11.1 \pm 0.14^a$

LIN (%): índice de linealidad; STR (%): índice de rectitud; WOB (%): índice de oscilación; ALH ( $\mu\text{m}$ ): amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y BCF (Hz): Frecuencia de Batida de la Cabeza. <sup>ab</sup> Letras distintas en las columnas muestran diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Por lo general, los autores que documentaron los valores para el índice de linealidad fueron algo superiores a los obtenidos en este trabajo, y los valores descritos para índice de rectitud fueron muy variables entre autores (Viudes-de-Castro., et al. 1999; Ferrian, 2007; Safaa et al., 2008; Lavara et al., 2008; 2010, 2012). Concerniente a los valores documentados para ALH, estos fueron similares a los observados en (Lavara et al., 2010; A Quintero-Moreno et al., 2007; Safaa et al., 2008) e inferiores para (Ferrian, 2007; Viudes-de-Castro et al., 2005; Lavara et al., 2012). Con respecto a la frecuencia de batida de la cabeza del espermatozoide, son pocos los trabajos donde incluyen la descripción de este parámetro (Quintero-Moreno, 2003; Safaa et al., 2008; Viudes-de-Castro et al., 2005).

Castellini et al., (2011) observan que los espermatozoide de las distintas especies domésticas y humanos, tienen diferentes características cinéticas, describiendo que los espermatozoides de conejo son los más rápidos, mientras los espermatozoides de humanos eran los más lentos. Por el contrario, los valores más altos de linealidad se corresponden con espermatozoides de humanos, seguido de toro, carnero y conejo.

Según Quintero-Moreno, (2003) los parámetro que mejor describen la motilidad espermática en conejos son VAP, LIN, ALH y BCF (0.95, 0.96, 0.93 y 0.75 con coeficientes de correlación respectivamente), estos mismos parámetros mostraron ser descriptores de la motilidad en semen de caballos y cerdos. Asimismo, indica que la subpoblación espermática mayoritaria presente en el conejo, describe una alta

motilidad progresiva y trayectoria lineal. Varios autores asocian los valores altos que se observan en VCL y ALH, y valores bajos en LIN, con un estado de hiperactivación espermática (Mortimer, 2000; Quintero-Moreno, 2003; Brun et al., 2006). Este estado se caracteriza por el movimiento vigoroso no progresivo de los espermatozoides, con grandes desplazamientos laterales de la cabeza y el movimiento del flagelo de toda la amplitud. Si nos basamos en nuestros resultados con valores ligeramente más bajos en LIN y más elevados para ALH y VCL (Tabla 12) en los eyaculados de los machos de la generación 36, esto podría indicar un mayor grado de “hiperactivación” frente a los de la generación 18. No obstante, cabe indicar que los parámetros cinéticos no están del todo dilucidados en relación a la predicción de la fertilidad in vivo, ya que la fertilidad envuelve un conjunto de factores, de los cuales cada factor aporta un efecto diferente en el resultado final.

En conejo la relación entre la calidad seminal y la fertilidad se ha estudiado mayoritariamente considerando la concentración o la motilidad espermática (Viudes-de-Castro y Vicente, 1997; Castellini y Lattaioli, 1999; Brun et al., 2002; García-Tomás et al., 2006c). No obstante, las características que se evalúan en un espermograma clásicos son, en general, pobres predictores de la fertilidad (García-Tomás et al., 2006c). Además, se tiene que tener en cuenta factores asociados al efecto materno de la hembra, al momento de determinar la fertilidad.

Además, según Piles et al., (2013), la contribución masculina a la fertilidad después del apareamiento natural y después de la IA con dosis de semen con alta concentración es mínimo, aunque se ha encontrado que, en condiciones de IA más restrictivas, las contribuciones del macho a la fertilidad y prolificidad son bajas. Asimismo, indicaron que la selección por GMD, no parece estar genéticamente correlacionada con la fertilidad masculina y las características seminales.

En general, a pesar de que las evaluaciones in vitro de la calidad seminal no permiten una evaluación precisa del potencial y la capacidad de fertilidad que presentan las muestras de semen. Sin embargo, son importantes ya que es una herramienta para determinar y discriminar aquellas muestras de semen de mala calidad. Por lo tanto, la evaluación de semen en laboratorio adquiere una vital importancia para la industria de la IA para proveer dosis de semen buena calidad. (Mocé y Graham, 2008)

#### **4.5. Análisis de fertilidad y prolificidad**

Los resultados de la evaluación de la calidad espermática in vivo se muestra en la tabla 14. Se realizaron un total de 152 inseminaciones (63 y 89 inseminaciones con semen de la generación 18 y 36 respectivamente) en hembras de la misma línea genética y generación. Valorando la tasa de fertilidad a palpación (12 días) y al parto, como también la prolificidad determinando los nacidos vivos y nacidos muertos al parto. Se obtuvieron un total de 86 partos (32 y 54 partos de los inseminados con semen de la generación 18 y 36 respectivamente), con los cuales se determinó la prolificidad.

Los resultados obtenidos mostraron que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la tasa de fertilidad a palpación y al parto, ni en la prolificidad al parto de los gazapos nacidos vivos y nacido muertos, entre la generación 18 y la generación 36.

**Tabla 14.** Tasa de fertilidad y prolificidad (*lsm ± e.s.*).

Gen	Nº IA	Tasa de fertilidad		Nº de partos	Prolificidad al parto	
		Palpación (12 días)	Parto		Nacidos vivos	Nacidos muertos
18	63	60.0 ± 6.1	54.0 ± 6.3	32	6.0 ± 0.60	0.9 ± 0.24
36	89	66.0 ± 5.0	61.0 ± 5.2	54	5.7 ± 0.46	0.8 ± 0.18

Los resultados mostrados en este estudio son algo inferiores (75% fertilidad y 9.8 nacidos vivos) a los descrito por Vicente et al., (2000). Sin embargo, los valores de fertilidad (palpación y al parto) y prolificidad obtenidos en este trabajo son similares al documentado por Lavara et al., (2010), donde observan 65% y 57% de fertilidad a palpación y al parto respectivamente y 7.9 de gazapos nacidos total. Estos resultados obtenidos en fertilidad y prolificidad confirman lo observado en la evaluación in vitro de la calidad espermática, donde no se encontraron diferencias significativas (entre los machos de la generación 18 y 36) en los parámetros que predicen mejor la capacidad fertilizante del espermatozoide.

## 5. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que la ganancia media diaria influye sobre el volumen del eyaculado y por ende en la producción espermática, pero no produce ninguna alteración de la calidad seminal.

## 6. CITAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alvariño, J. M. R. (2000). Reproductive performance of male rabbits. In *7th World Rabbit Congress, A*, 13–36.
- Ariño, B. (2006). *Variabilidad genética de la calidad de la carne de conejo*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Armero, Q., & Blasco, A. (1992). Economic weights for rabbit selection indices. *Journal of Applied Rabbit*, *15*, 637–642.
- Baselga, M. (2004). Genetic improvement of meat rabbits. Programmes and diffusion. In *8th World Rabbit Congress*, 1–13.
- Blasco, A., Baselga, M., & Estany, J. (1984). *Mejora genética del conejo*. Valencia-España.
- Blasco, A., Piles, M., & Varona, L. (2003). A Bayesian analysis of the effect of selection for growth rate on growth curves in rabbits. *Genetics Selection Evolution*, *35*, 21–41.
- Brugo Olmedo, S., Calamera, J., González, O., Deparci, A., Verdinelli, J. (1995). La morfología espermática y su importancia como diagnóstico de capacidad fertilizante. *Revista Argentina de Urología*, *60*, 35–56.
- Brun, J. M., Sanchez, A., Ailloud, E., Saleil, G., & Theu-Clément, M. (2016). Genetic parameters of rabbit semen traits and male fertilising ability. *Animal Reproduction Science*, *166*, 15–21.
- Brun, J. M., Theau-Clément, M., & Bolet, G. (2002). The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, *70*, 139–149.
- Brun, J. M., Theau-Clément, M., Esparbié, J., Falières, J., Saleil, G., & Larzul, C. (2006). Semen production in two rabbit lines divergently selected for 63-d body weight. *Theriogenology*, *66*, 2165–2172.
- Castellini C., Lattaioli P., Cardinali R., Bosco, A. (2006). Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet concentration of rabbit semen. *World Rabbit Science*, *14*, 101–106.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., & Collodel, G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*, *96*, 24–27.
- Castellini, C., & Lattaioli, P. (1999). Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Animal Reproduction Science*, *57*, 111–120.
- Castellini, C., Lattaioli, P., Cardinali, R., Bosco, A., & Mourvaki, E. (2007). Validation of a spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. *World Rabbit Science*, *15*, 115–119.
- Cifre, J., Baselga, M., García-Ximénez, F., & Vicente, J. S. (1998). Performance of a hyperprolific rabbit line I. Litter size traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *115*, 131–138.
- Estany, J., Baselga, M., Blasco, A., & Camacho, J. (1989). Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. *Livestock Production Science*, *21*, 67–75.
- Estany, J., Camacho, J., Baselga, M., & Blasco, A. (1992). selection response of growth rate in Rabbits for Meat Production. *Genetics Selection Evolution*, *24*, 527–537.
- Ferran, S. (2007). *Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación*. Tesis fin de máster, Universidad Politécnica de Valencia.
- García-Tomás, M., Sánchez, J., Rafael, O., Ramon, J., & Piles, M. (2006). Relación entre parámetros de calidad seminal y fertilidad. In *XXXIII Symposium de Cunicultura*, 23–28.
- García-Tomás, M., Sánchez, J., Rafel, O., Ramon, J., & Piles, M. (2006a). Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livestock Science*, *100*, 111–120.

- García-Tomás, M., Sánchez, J., Rafel, O., Ramon, J., & Piles, M. (2006b). Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. *Animal Reproduction Science*, *93*, 88–100.
- Garner, D., & Johnson, L. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, *53*, 276–284.
- International Rabbit Reproduction Group. (2005). Guidelines for the handling of rabbit buck and semen. In *World Rabbit Science*, *13*, 71–91.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, *70*, 219–228.
- Lavara, R. (2013). *Genetics of fresh and frozen-thawed semen traits and their relationship with growth rate in rabbits*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Lavara, R., Baselga, M., & Vicente, J. S. (2010). Aneuploidy in rabbit males: Semen traits and fertility. *Theriogenology*, *74*, 105–110.
- Lavara, R., Moce, E., & Vicente, J. (2003). Buenas prácticas en inseminación artificial I. *Lagomorfa*, *128*, 14–23.
- Lavara, R., & Vicente, J. (2001). Estado actual de la reproducción en cunicultura. *Lagomorfa*, *113*, 24–32.
- Lavara, R., Vicente, J., & Baselga, M. (2011). Genetic parameter estimates for semen production traits and growth rate of a paternal rabbit line. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *128*, 44–51.
- Lavara, R., Vicente, J., Marco-jiménez, F., & Baselga, M. (2008). Correlation between CASA and ASMA parameters in rabbit semen. In *9th World Rabbit Congress*, *9*, 381–386.
- Lavara, R., Vicente, J. S., & Baselga, M. (2012). Estimation of genetic parameters for semen quality traits and growth rate in a paternal rabbit line. *Theriogenology*, *78*, 567–575.
- Lavara, R., Vicente, J. S., & Baselga, M. (2013). Genetic variation in head morphometry of rabbit sperm. *Theriogenology*, *80*, 313–318.
- Marco-Jiménez, F., Vicente, J., Lavara, R., Balasch, S., & Viudes-de-Castro, M. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*, 118–123.
- Mínguez, C. (2012). *Comparación de cuatro líneas maternas de conejo en caracteres de crecimiento*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Mocé, E., & Graham, J. K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, *105*, 104–118.
- Mocé, E., Lavara, R., Lavara, F., & Vicente, J. (2000). Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line with high growth rate. In *7th World Rabbit Congress*, *8*, 197–201.
- Mortimer, S. T. (2000). CASA — Practical Aspects Andrology Lab Corner. *Journal of Andrology*, *21*, 515–524.
- Naturil-Alfonso, C., Lavara, R., Millan, P., Rebollar, P. G., Vicente, J. S., & Marco-Jiménez, F. (2016). Study of failures in a rabbit line selected for growth rate. *World Rabbit Science*, *24*, 47–53.
- Naturil-Alfonso, C., Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Saenz-de-Juano, M. D., Viudes-de-Castro, M. P., Lavara, R., & Vicente, J. S. (2015). Role of embryonic and maternal genotype on prenatal survival and foetal growth in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*, 312–320.
- Pascual, J., García, C., Martínez, E., Mocé, E., & Vicente, J. (2004). Rearing management of rabbit males selected by high growth rate: the effect of diet and season on semen characteristics. *Reproduction Nutrition Development*, *44*, 49–63.

- Piles, M., Gomez, E. A., Rafel, O., Ramon, J., & Blasco, A. (2004). Elliptical selection experiment for the estimation of genetic parameters of the growth rate and feed conversion ratio in rabbits. *Journal of Animal Science*, *82*, 654–660.
- Piles, M., Tusell, L., Lavara, R., & Baselga, M. (2013). Breeding programmes to improve male reproductive performance and efficiency of insemination dose production in paternal lines: Feasibility and limitations. *World Rabbit Science*, *21*, 61–75.
- Quintero-Moreno, A. (2003). *Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo*. Tesis doctoral, Universidad Autonoma de Barcelona.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. (2007). Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reproduction in Domestic Animals*, *42*, 312–319.
- Roca, J., Martínez, S., Orengo, J., Parrilla, I., Vázquez, J. M., & Martínez, E. A. (2005). Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under natural environment conditions of Mediterranean area. *Livestock Production Science*, *94*, 169–177.
- Rochambeau, H. (2000). Artificial insemination and genetic lag of improvement nucleus to commercial herd. In *7Th World Rabbit Congress, A*, 353–360.
- Ródenas, L., Martínez, E., Savietto, D., Fernández, J., Prendes, R., Domingues, V., ... Pascual, J. . (2008). Efecto de los parámetros ambientales y productivos sobre la calidad seminal de machos seleccionados por alta velocidad de crecimiento. In *XXXIII Symposium de ASESCU*.
- Safaa, H., Vicente, J., Lavara, R., & Viudes-de-Castro, M. (2008). Semen evaluation of two selected lines of rabbit bucks. *World Rabbit Science*, *16*, 141–148.
- Sánchez, J. P., Theilgaard, P., Mínguez, C., & Baselga, M. (2008). Constitution and evaluation of a long-lived productive rabbit line. *Journal of Animal Science*, *86*, 515–525.
- Tusell, L., Legarra, A., García-Tomás, M., Rafel, O., Ramon, J., & Piles, M. (2012). Genetic basis of semen traits and their relationship with growth rate in rabbits. *Journal of Animal Science*, *90*, 1385–1397.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, *57*, 149–179.
- Vicente, J., Llobat, L., Viudes-de-Castro, M., Lavara, R., Baselga, M., & Marco-Jiménez, F. (2012). Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. *Theriogenology*, *77*, 81–88.
- Vicente, J., Llobat, M., Jiménez-Trigos, E., Lavara, R., & Marco-Jiménez, F. (2013). Effect of embryonic and maternal genotype on embryo and foetal survival in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, *48*, 402–406.
- Vicente, J., Viudes de Castro, M., Lavara, R., & Lavara, F. (2000). Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. In *7th World Rabbit Congress*, *8*, 273–277.
- Viudes de Castro, M., & Vicente, J. (1997). Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. *Animal Reproduction Science*, *46*, 313–319.
- Viudes de Castro, M., Vicente, J., & Lavara, R. (1999). Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin. *Ann. Zootech*, *48*, 407–412.
- Viudes-de-Castro, M., Mocé, E., Vicente, J., Marco-Jiménez, F., & Lavara, R. (2005). In vitro evaluation of in vivo fertilizing ability of frozen rabbit semen. *Reproduction in Domestic Animals*, *40*, 136–140.