

COMUNICACIÓN CORTA

## Efecto de la criopreservación de semen de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal

P.J.E. Hernández<sup>I</sup>, R.F. Fernández<sup>I</sup>, S.J.L. Rodríguez<sup>I</sup>, R.M. Negrete<sup>II</sup>, M.Y.G. Soto<sup>II</sup>,  
R.A.D. García<sup>II</sup>

<sup>I</sup>Laboratorio Manejo de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. México, D.F. email: [ehernan@correo.xoc.uam.mx](mailto:ehernan@correo.xoc.uam.mx). <sup>II</sup>Clínica privada. México, D.F.

**RESUMEN:** El objetivo del estudio fue investigar el efecto de la criopreservación sobre la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides de conejo de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). Se utilizaron 46 eyaculados, obtenidos mediante vagina artificial, evaluándose las siguientes características en semen fresco y post-descongelado: % de viabilidad sin y con reacción acrosomal (VsRA y VcRA, respectivamente), y % de mortalidad sin y con reacción acrosomal (MsRA y McRA, respectivamente), mediante la tinción de Isotiocianato de fluoresceína conjugada con la lectina de *Arachis Hypogaea* y Ioduro de Propidio (FITC-PNA/IP). Se obtuvieron los siguientes valores en semen fresco: 73.6±4.9%, 5.5±2.4%, 15.2±3.7% y 5.6±2.3%, respectivamente; y para semen post-descongelado: 40.0±4.8%, 10.4±3.1%, 38.1±6.1 y 11.5±3.6, respectivamente. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las características espermáticas en fresco y post-descongeladas, causadas por los efectos de la criopreservación. Se concluye que aún cuando la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides se ven afectados por la criopreservación, queda suficiente cantidad de espermatozoides vivos y sin reacción acrosomal capaces de realizar la fertilización.

**Palabras clave:** criopreservación, viabilidad, reacción acrosomal, FITC-PNA/IP, *Oryctolagus cuniculus*.

---

### Effect of cryopreservation on viability and the acrosomal state of new zeland rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen

**ABSTRACT:** The effect of cryopreservation on the viability and the acrosomal state of spermatozoa of New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) was studied. Forty six ejaculates, obtained with an artificial vagina, were used to determine the percentages of viability and mortality with and without acrosomal reaction (VsRA, VcRA, MsRA and McRA, respectively) in fresh and post-thawed semen by staining with fluorescein isothiocyanate conjugated with lectine from *Arachis Hypogaea* and propidium iodide (FITC-PNA/IP). The values obtained in fresh semen were 73.6±4.9%, 5.5±2.4%, 15.2±3.7% and 5.6±2.3%, respectively, and 40.0±4.8%, 10.4±3.1%, 38.1±6.1 y 11.5±3.6, respectively, in post-thawed semen. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were determined between the spermatoc characteristics in fresh and post-thawed semen, which were caused by the effects of cryopreservation. It is concluded that, even when the viability and the acrosomal state of the spermatozoa are affected by cryopreservation, a sufficient quantity of spermatozoa remains alive and without acrosomal reaction capable to fulfill the fertilization.

**Palabras clave:** cryopreservation, viability, acrosomal reaction I, FITC-PNA/IP, *Oryctolagus cuniculus*.

---

El conejo es un valioso animal de laboratorio utilizado tanto en investigaciones dirigidas a estudiar la función del espermatozoide en la fertilización; como en estudios sobre toxicología, teratología, inmunología, microbiología y transgénesis (1, 2, 3). De ahí la necesidad de investigar métodos más confiables para la

conservación de recursos genéticos de conejo de manera eficiente en bancos de criopreservación. Por otro lado, los espermatozoides de conejo se usan para investigar nuevos crioprotectores y métodos de congelación, en función de que son altamente sensibles a dicho proceso (2, 4).

Se conoce que la Inseminación Artificial (I.A) en los sistemas de producción de conejos es una práctica común (5), en base al uso de semen fresco o refrigerado, resultando en altas tasas de concepción como las obtenidas con monta natural que es de 80.0% (6, 7), sin embargo cuando se usa semen pos-descongelado, se reporta descenso en los porcentajes de fertilidad hasta un 47.0% (8). La congelación-descongelación incrementan la capacitación y reacción acrosomal (RA) espermática. En ese proceso, se debe considerar que la evaluación del acrosoma es importante debido a que es fundamental durante la fecundación. Los daños en el acrosoma provocan que se liberen las enzimas que alberga en su interior, perdiendo la capacidad de fecundación (9). En el semen principalmente post-descongelado es importante saber qué porcentaje están vivos y sin RA, que son los que interesan para usarse en técnicas de reproducción asistida. Una herramienta muy precisa para evaluar la viabilidad del espermatozoide y su estado acrosomal es la tinción de Isotiocianato de fluoresceína conjugada con la lectina de *Arachis Hypogaea* y Ioduro de Propidio (FITC-PNA/IP). En espermatozoides sin RA, los acrosomas permanecen sin teñir, mientras que los espermatozoides con RA, se tiñen de verde (10). El Ioduro de Propidio (IP) es una tinción específica de DNA que no puede entrar en membranas intactas y solo penetran en las células que han perdido la integridad de la membrana tiñéndolos de color rojo (11). En investigaciones anteriores utilizando la tinción FITC-PNA/IP, para evaluar espermatozoides obtenidos de eyaculados de la especie ovina (12), así como espermatozoides recuperados de cola de epidídimo de equinos (13) y sujetos al proceso de criopreservación se llegó a la conclusión de que se obtienen suficiente cantidad de espermatozoides vivos y sin reacción acrosomal útiles para su empleo en técnicas de reproducción asistida. Al no encontrarse reportes sobre la viabilidad y estado acrosomal utilizando la tinción de FITC-PNA/IP en semen post-descongelado de conejo El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la viabilidad y estado

acrosomal de espermatozoides de conejo con el empleo de la tinción referida como criterio evaluativo.

El presente estudio se llevó a cabo con 46 eyaculados obtenidos con vagina artificial a dos conejos de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), sexualmente activos a los que se les brindó comida y agua *ad libitum*, con temperatura controlada de 18°C., a 20°C., y ciclos de luz-oscuridad de 12x12 horas (14), dichas muestras fueron evaluadas en el Laboratorio «Manejo de la Reproducción» de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. La viabilidad y estado acrosomal de los espermatozoides, se determinó mediante la tinción de Isotiocianato de fluoresceína conjugada con la lectina de *Arachis Hypogaea* y Ioduro de Propidio (FITC-PNA/IP), según la metodología de García-Roselló *et al.* (15). Los espermatozoides se clasificaron de acuerdo al patrón de tinción en vivos o muertos y con o sin reacción acrosomal (16). El semen fue congelado con el diluyente Tris-ácido cítrico-glucosa incluyendo 1.75M de DMSO y 0.05M de sucrosa y envasado en pajillas de 0.5 mL a una concentración de  $30 \times 10^6$ /mL (3), descongelándolas a 37°C., por 45 segundos. Los indicadores evaluados a los espermatozoides fueron: vivos sin RA VsRA, vivos con RA VcRA, muertos sin RA MsRA y muertos con RA McRA.

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 13.0, para comparar las características espermáticas se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA y «t» de Student con nivel de significación 0,05 (17).

Existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las características espermáticas evaluadas en fresco y pos-descongeladas de semen de conejo (Tabla 1).

En semen fresco se determinó un 73.6% de espermatozoides vivos sin RA y solo un 5.5% de espermatozoides vivos con RA, siendo el resto (20.8%) de espermatozoides muertos sin y con RA. La mayoría de las investigaciones solo reportan el porcentaje de espermatozoides con o sin RA, si lo consideramos

**TABLA 1.** Viabilidad y estado acrosomal de semen fresco y pos-descongelado de 46 eyaculados de conejo./ *Viability and acrosomal state of fresh and post-thawed semen from 46 rabbit ejaculates*

	Viabilidad y estado acrosomal			
	VsRA	VcRA	MsRA	McRA
Fresco	73,6±4,9 <sup>a</sup>	5,5 ±2,4 <sup>a</sup>	15,2±3,7 <sup>a</sup>	5,6±2,3 <sup>a</sup>
Pos descongelado	40,±4,8 <sup>b</sup>	10,4±3,1 <sup>b</sup>	38,1±6,1 <sup>b</sup>	11,5±3,6 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Literal diferente en hilera indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

RA= Reacción acrosomal, VsRA= Vivos sin RA, VcRA= Vivos con RA, MsRA = Muertos sin RA, McRA = Muertos con RA.

así en esta investigación se tendrían 88.8% de espermatozoides sin RA y 11.2% de espermatozoides con RA. Lo anterior es similar a lo reportado por Castellini *et al.* (8) y Viudes de Castro *et al.* (18) que reportan un 12.2% y 13.0% de espermatozoides con reacción acrosomal, determinándolo mediante la tinción FITC-PNA y contraste de fase, respectivamente, pero superior a lo reportado por Hernández *et al.* (19), con 9.5%, usando azul de Comassie. El porcentaje de espermatozoides sin RA debe ser superior al 80.0% en semen fresco, ya que si hay un porcentaje elevado de espermatozoides con acrosomas dañados en el eyaculado, la fertilidad se reduce (20). Mientras que en semen post-descongelados se determinó un 40.0% de espermatozoides vivos sin RA, que son los que mantienen la capacidad de fecundar. Sin tomar en cuenta la viabilidad, el porcentaje de espermatozoides con RA se incrementó a 21.9% en semen descongelado, sin embargo este valor es inferior a lo reportado por Si *et al.* (14) y Castellini *et al.* (8) que reportan un 61.5% y 55.3%, respectivamente de espermatozoides con RA sin especificar qué porcentaje de ellos estaban vivos o muertos.

Se concluye que la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides se ven afectados por la criopreservación, no obstante queda suficiente cantidad de espermatozoides vivos y sin reacción acrosomal capaces de realizar la fertilización.

## REFERENCIAS

1. Arriola J, Foote RH. Accessory sperm as an indication of fertilizing ability of rabbit spermatozoa frozen egg yolk-acetamide with detergent. *J Androl.* 2001; 22(3):458-463.
2. Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of japanese white rabbit spermatozoa. *J Reprod Dev.* 2006;52(4): 511-516.
3. Mocé E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim Reprod Sci.* 2009; 110:1-24.
4. Dalimata AM, Grahamn JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology.* 1997;48:831-841.
5. López FJ, Alvarino JMR. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerate rabbit semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;58:147-154.
6. Rosato M, Iaffaldano N. Effect of chilling temperature on the long-term survival of rabbit spermatozoa held either in a tris-based or a jellified extender. *Reprod Dom Anim.* 2011;46:301-308.
7. Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci.* 2000;64:103-112.
8. Castellini C, Pizza F, Theau-Clément M, Lattaioli P. Effect of different number of frozen spermatozoa inseminated on the reproductive performance of rabbit does. *Theriogenology.* 2006;66:2182-2187.
9. González UA. Contrastación seminal. *Cunicultura.* 2002;27(160):394-399.
10. Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:239-247.
11. Flajshans MJ, Cosson M, Linthart O. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biol International.* 2004; 28:955-959.
12. Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Juárez RE, Soto MYG, García RAD. Efecto de la criopreservación de semen de ovino en relación a su viabilidad y estado acrosomal. *Rev Salud Anim.* 2012;34(2):78-83.
13. Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Soto MYG, Verona JEH, García RAD. Evaluación de la viabilidad y reacción acrosomal de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de equino antes y después de la congelación. *Rev Salud Anim.* 2012;34(2):84-88.
14. Si W, Hildebrandt TB, Reid C, Krieg R, Fassbender JW, Hermes R. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology.* 2006;65:788-798.
15. García-Roselló E, Matás C, Cánovas S, Moreira PN, Gadea J, Coy P. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J Androl.* 2006;27(2):268-275.

16. García MR. Efecto de los inhibidores de H<sup>+</sup>-ATPasas durante la maduración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México. 2000.
17. Álvarez R. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Ed. Díaz de Santos, España. 2007.
18. Viudes de Castro MP, Mocé E, Vicente JS, Marco-Jiménez F, Lavara R. *In vitro* evaluation of *in vivo* fertilizing ability of frozen rabbit semen. *Reprod Domest Anim.* 2005;40:136-140.
19. Hernández JE, Fernández RF, Avalos RA, Díaz BR, Olvera VFA. Efecto de la adición de gelatina a semen de conejo almacenado a 12°C. *Rev Salud Anim.* 2004;26(3):197-201.
20. Lavara R, Mocé E, Vicente JS. Buenas prácticas en inseminación artificial I: Preparación de dosis seminales. *Boletín de Cunicultura.* 2003;128(26):14-23.

**Recibido: 17-12-2011.**

**Aceptado: 20-7-2012.**