



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Efecto de la presencia de Ficoll-70 o dextrano-70 en el medio de congelación de semen de conejo en su calidad y capacidad fecundante.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Gianfrancesco , Pamela Sol Gema

Tutor/a: Vicente Antón, José Salvador

Cotutor/a externo: VIUDES DE CASTRO, MARIA PILAR

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL  
MEDI NATURAL**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**Efecto de la presencia de Ficoll-70 o Dextrano-70 en el  
medio de congelación de semen de conejo en su calidad  
y capacidad fecundante**

TRABAJO FINAL DE GRADO  
Curso académico: 2021/2022



València, septiembre de 2022

**Autora:** Pamela Sol Gema Gianfrancesco

**Tutora:** María Pilar Viudes de Castro

**Tutor académico:** José Salvador Vicente Antón

**Título:**

Efecto de la presencia de Ficoll-70 o Dextrano-70 en el medio de congelación de semen de conejo en su calidad y capacidad fecundante.

**Resumen:**

La elección de los componentes de los medios de congelación, entre ellos los crioprotectores, influye decisivamente en la supervivencia y funcionalidad de los espermatozoides. Los principales crioprotectores utilizados actualmente para la crioconservación de semen de conejo son una combinación de permeables, como la acetamida o el dimetilsulfóxido y no permeables, como la lactosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa, y más recientemente el dextrano. La mayoría de los estudios analizan únicamente los efectos *in vitro* de los diferentes medios de congelación, por lo que existe poca información sobre sus efectos sobre la fertilidad y prolificidad de la hembra. En este contexto, el objetivo de este estudio es evaluar la acción protectora del dimetilsulfóxido en combinación con dos polisacáridos, de igual peso molecular pero distinta conformación espacial, el ficoll-70 y el dextrano-70, sobre diferentes parámetros de calidad seminal *in vitro* y a su capacidad fecundante *in vivo*. Para ello, la motilidad de los espermatozoides fue evaluada mediante un sistema de análisis espermático asistido por ordenador (CASA), la integridad de las membranas y la viabilidad de los espermatozoides se midió mediante citometría de flujo y la sensibilidad a la capacitación se estudió mediante un test biológico con co-cultivo de células oviductales en el que se observó el número de espermatozoides adheridos a la placa por cm<sup>2</sup>. Por último, la capacidad fecundante *in vivo* de los espermatozoides congelados se evaluó mediante inseminación artificial, obteniéndose al parto la tasa de fertilidad (número de hembras paridas/número de hembras inseminadas) y la prolificidad (número de crías totales y vivas nacidas).

Tras la evaluación tanto *in vivo* como *in vitro* no se detectaron diferencias entre ambas macromoléculas en los parámetros de seminales de viabilidad total, daños en acrosoma, motilidad total y progresiva tras la congelación, ni en la tasa de fertilidad y prolificidad tras la inseminación. En cuanto al test biológico, los espermatozoides congelados con dextrano tuvieron mayor capacidad de adherencia al epitelio oviductal reconstruido, lo que podría sugerir que el dextrano y el ficoll interaccionan o conservan de modo diferencial la membrana espermática, sin embargo, esta diferencia no se ve reflejada en los resultados *in vivo*. Por lo que ambas macromoléculas contribuyen de manera similar en el proceso de congelación-descongelación del semen.

**Palabras clave:**

Conejo, medio de congelación, semen, dextrano y ficoll.

**Title:**

Effect of the presence of Ficoll-70 or Dextran-70 in the freezing medium of rabbit semen on its quality and fertilising ability.

**Abstract:**

The selection of freezing media components, including cryoprotectants, has a decisive influence on the survival and functionality of the spermatozoa. The main cryoprotectants currently used for rabbit sperm cryopreservation are a combination of permeable, such as acetamide or dimethyl sulfoxide, and non-permeable, such as lactose, sucrose, raffinose, trehalose, and more recently dextran. Most studies only analyse the *in vitro* effects of the different freezing media, so there is little information on their effects on female fertility and prolificacy. In this context, the purpose of this study is to evaluate the protective action of dimethyl sulfoxide in combination with two polysaccharides of equal molecular weight but different spatial conformation, ficoll-70 and dextran-70, on different parameters of seminal quality *in vitro* and their fertilising ability *in vivo*. For this purpose, sperm motility was evaluated using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system, membrane integrity and sperm viability were measured by flow cytometry and capacitation sensitivity was studied by a biological test with co-culture of oviductal cells in which the number of spermatozoa adhering to the plate per cm<sup>2</sup> was observed. Finally, the fertilising ability of the frozen spermatozoa was evaluated by artificial insemination, obtaining the fertility rate at birth (number of females giving birth/number of females inseminated) and prolificacy (number of total and live kits born).

After both *in vivo* and *in vitro* evaluation, no differences were detected between both macromolecules in the seminal parameters of total viability, damaged acrosome membrane, total and progressive motility, and neither in fertility rate and prolificacy at birth after artificial insemination of does. In terms of the biological test, sperm frozen with dextran had a greater capacity to adhere to the reconstructed oviductal epithelium, which could suggest that dextran and ficoll differentially interact or preserve the sperm membrane, however, this difference is not reflected in the *in vivo* results. Therefore, both macromolecules contributed equivalently to sperm cryoprotection in the freezing-thawing process.

**Key words:**

Rabbit, freezing medium, sperm, dextran and ficoll.

**Alumna:** Dña. Pamela Sol Gema Gianfrancesco

**Tutora experimental:** Dña. María Pilar Viudes de Castro

**Tutor académico:** Prof.D. José Salvador Vicente Antón

València, septiembre de 2022



## **AGRADECIMIENTOS:**

Me gustaría agradecer tanto a mi tutora del TFG María Pilar Viudes de Castro como a mi cotutor José Vicente Antón su implicación en el desarrollo de mi proyecto final. Gracias por enseñarme y ayudarme a comprender mejor esta rama tan bonita que es la biología de la reproducción. Vuestra cercanía y amabilidad han facilitado mucho tanto la ejecución de la parte práctica como la redacción de este trabajo.

También, me gustaría agradecer a mi familia el apoyo incondicional recibido a lo largo de estos años de carrera. No habría sido posible llegar hasta aquí sin ellos y me considero muy afortunada de tenerlos a mi lado. De la misma forma, mi pareja ha sido un pilar fundamental este tiempo. Johan, gracias no solo por ser el mejor compañero de piso del mundo, sino por ayudarme a verlo todo con perspectiva en mis peores días y por comprarme sushi en aquellos en los que lo primero no funcionaba.

La carrera, además de un título, me deja personas increíbles en mi vida. No puedo estar más agradecida de haberme cruzado con vosotros y de haber compartido esta etapa tan especial. Destaco a dos personas que prácticamente se han vuelto de mi familia, Isabel e Inés. Estoy segura de que vais a conseguir todo lo que os propongáis y vais a ser grandes profesionales. Gracias por ser mi dosis diaria de vitamina.

Por último, a mis amigos de toda la vida también quiero agradecerles su apoyo en la distancia y sus constantes visitas a Valencia. Gracias por hacerme sentir siempre como en casa, por aconsejarme y ayudarme siempre que lo he necesitado, especialmente a Noemi.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL CONEJO COMO MODELO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN .....	1
1.2 CONGELACIÓN DE SEMEN .....	2
1.3 CRIOPROTECTORES Y DILUYENTES DE CONGELACIÓN .....	3
1.4 PROTOCOLOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN .....	5
1.5 CAMBIOS ESTRUCTURALES DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA CONGELACIÓN .....	7
1.6 EFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN .....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	10
3.2 ANIMALES .....	10
3.3 RECUPERACIÓN DEL SEMEN.....	10
3.4 EVALUACIÓN DEL SEMEN .....	11
3.4.1 Concentración.....	11
3.4.2 Normalidad, gota citoplasmática y porcentaje de acrosomas reaccionados .....	11
3.4.3 HOST .....	12
3.4.4 Motilidad .....	12
3.4.5 Viabilidad y daños en el acrosoma .....	13
3.4.6 Test biológico.....	14
3.5 COMPOSICIÓN DE LOS DILUYENTES DE CONGELACIÓN .....	17
3.6 PROCEDIMIENTO DE CONGELACIÓN .....	17
3.7 PROCEDIMIENTO DE DESCONGELACIÓN .....	18
3.8 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL .....	18
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS SEMINALES FRESCAS .....	20
4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS CONGELADAS CON DEXTRANO Y FICOLL.....	21
4.2.1 Características seminales de viabilidad, daños en el acrosoma y motilidad post- congelación .....	21
4.2.2 Test biológico.....	23
4.3 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE <i>IN VIVO</i> .....	24
4.3.1 Tasa de fertilidad al parto.....	25
4.3.2 Prolificidad .....	25
5. CONCLUSIONES .....	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura. 1</b> Estructura de algunos crioprotectores permeables y no permeables utilizados durante los procesos de criopreservación (Weng et al., 2019). .....	5
<b>Figura. 2</b> Esquema del proceso de criopreservación de semen de conejo mediante congelación lenta o vitrificación (Nishijima et al., 2021). .....	6
<b>Figura. 3</b> Vagina artificial preparada para la recolección de semen con el recubrimiento de látex, el tubo recolector y el agua a 50°C. ....	10
<b>Figura. 4</b> Espermatozoides de la zona superior de la imagen con cola enrollada debido a la respuesta generada por el medio hipoosmótico y espermatozoide central con cola completamente estirada por falta de respuesta de la membrana. ....	12
<b>Figura. 5</b> Microscopio Nikon Eclipse E300 utilizado durante la evaluación de la motilidad de las muestras (5.1) y cámara Makler (5.2). ....	13
<b>Figura. 6</b> Citómetro de flujo CytoFLEX utilizado durante el análisis de viabilidad y evaluación del estado del acrosoma equipado con su depósito de agua destilada y de residuos. ....	13
<b>Figura. 7</b> Representaciones gráficas de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en combinación con tinción con Hoechst 33,342, yoduro de propidio y FITC-PNA de una muestra de semen fresco. En 7.1) se presenta Hoechst 33342 vs PI y en 7.2) se presenta PI vs FITC-PNA. ....	14
<b>Figura. 8</b> 8.1) Útero de coneja extirpado con corte realizado a la altura del istmo para aislar el oviducto. 8.2) Ovario y oviducto tras retirar toda la grasa circundante. 8.3) Apertura en canal del oviducto introduciendo la punta de las tijeras por el infundíbulo y cortando a lo largo de todo el canal. 8.4) Epitelio oviductal desplegado y totalmente expuesto para facilitar la digestión enzimática. ....	16
<b>Figura. 9</b> Tapiz de células epiteliales del oviducto de conejo tras la incubación con las muestras de semen criopreservadas con 9.1) Dextrano y 9.2) Ficoll. ....	17
<b>Figura. 10</b> Caja de poliestireno con nitrógeno líquido utilizada durante el proceso de congelación de las pajuelas. ....	18
<b>Figura. 11</b> Porcentajes medios de viabilidad, de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI), motilidad total y progresiva obtenidos tras el proceso de congelación con cada diluyente de congelación. ....	21
<b>Figura. 12</b> Número medio de espermatozoides/cm <sup>2</sup> adheridos al cultivo de células epiteliales de oviducto de conejo obtenido para cada macromolécula. Las columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas (p-value<0,05). ....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla. 1** Media de las características de las muestras seminales frescas junto a su error estándar. .... 20

**Tabla. 2** Tasa media de fertilidad al parto y número medio de nacidos totales y vivos de los diferentes grupos experimentales. Los datos se presentan como la media por mínimos cuadrados junto con su error estándar (LSM±SE). ..... 24

**Tabla. 3** Tasa de fertilidad al parto y número de nacidos totales y vivos obtenido para el semen criopreservado y el semen fresco. Los datos se presentan como la media por mínimos cuadrados junto con su error estándar (LSM±SE). ..... 24

## **ABREVIATURAS**

**ATP:** adenosín trifosfato

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CASA:** computer-assisted semen analysis

**CITA-IVIA:** centro de investigación y tecnología animal del instituto valenciano de investigaciones agrarias

**CO<sup>2</sup>:** dióxido de carbono

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**FITC-PNA:** lectina de cacahuete conjugada con fluoresceína

**g:** gramos

**GLM:** modelo lineal general univariado

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas

**h:** horas

**HOST:** prueba hipoosmótica

**ICSI:** inyección intracitoplasmática

**M:** molar

**MAI:** muertos con acrosoma intacto

**MAR:** muertos con acrosoma reaccionado

**mg:** miligramos

**min:** minutos

**ml:** mililitros

**mOsm:** miliosmoles

**NAR:** acrosoma no reaccionado

**PBS:** tampón fosfato salino

**PI:** yoduro de propidio

**ROECs:** células epiteliales oviductales de conejo

**ROS:** especies reactivas del oxígeno

**rpm:** revoluciones por minuto

**s:** segundos

**TCG:** tris-ácido cítrico-glucosa

**UI:** unidades internacionales

**VAI:** vivos con acrosoma intacto

**μl:** microlitro

**μm:** micrómetro

**°C:** grados centígrados

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El conejo como modelo animal de experimentación

El conejo es un animal relevante, no solo debido su uso en la industria cárnica o la textil, sino también por su papel en el mundo de la investigación (Nishijima et al., 2021). La búsqueda de un modelo animal adecuado en este ámbito resulta clave para la obtención de resultados precisos y comparables, en el caso de los conejos, estos son comúnmente utilizados en investigación biomédica debido a su similitud con los humanos en lo referente al desarrollo embrionario temprano, a la fisiología cardiovascular, pulmonar y metabolismo lipídico (Fischer et al., 2012; Kamaruzaman et al., 2013; Nishijima et al., 2021). Además, son de gran utilidad en las pruebas de cribado de fármacos, estudios toxicológicos, de seguridad y reproductivos, siendo el animal más usado en producción de anticuerpos y proteínas terapéuticas (Kamaruzaman et al., 2013; Matsuhisa et al., 2020).

El uso del conejo como modelo animal en investigación presenta diversas ventajas frente a otros. Se tratan de animales manejables, debido al tamaño, y altamente disponibles en razas genéticamente homogéneas que requieren de menos recursos, tanto a nivel de instalaciones como de mantenimiento, por lo que económicamente son más asequibles (Liu et al., 2012; Matsuhisa et al., 2020). Filogenéticamente son más cercanos al hombre que los ratones y están bien caracterizados, son los animales de experimentación más pequeños no-roedores (Foote & Carney, 2000; Kamaruzaman et al., 2013). A pesar de esto, tienen un tamaño lo suficientemente grande como para poder extraer varias muestras a un mismo individuo y monitorizar la respuesta sin causar la muerte. La obtención de muestras de sangre para su posterior análisis se puede realizar de manera sencilla a través de la vena marginal de la oreja, sin ocasionar grandes daños (Foote & Carney, 2000; Matsuhisa et al., 2020).

Junto con lo anterior, destaca su elevada tasa reproductiva. En el campo de la reproducción, la investigación con este modelo está muy extendida (Fischer et al., 2012). Se pueden utilizar distintas razas de conejo, pero en la mayoría de los casos se recurre a la neozelandesa dada su baja agresividad y su menor probabilidad de sufrir problemas de salud (Thomas et al., 2012).

A los conejos macho se les realizan extracciones de semen, evaluándose este mediante microscopía y/o citometría de flujo, permitiendo así poder monitorear el efecto de sustancias que se administren sobre las características de los espermatozoides y la fertilidad de éstos realizando inseminaciones artificiales (Foote & Carney, 2000). El semen de conejo se caracteriza por tener una concentración de 150-500 millones de espermatozoides/ml y un volumen de 0,4 a 1,2 ml por eyaculado. Además, la membrana espermática posee un ratio colesterol:fosfolípidos elevado y uno de ácidos grasos poliinsaturados:saturados bajo al igual que ocurre en humanos, por lo que se trata de un semen que soporta muy bien cualquier estrés que se genere, como puede ser el caso de la congelación y descongelación de muestras. Esta combinación de ratios le proporciona una fluidez intermedia, dado que el colesterol es el encargado de modular la fluidez de las membranas (Mocé & Vicente, 2009).

En lo que respecta a las hembras de conejo, se utiliza la técnica de inseminación artificial para evaluar la prolificidad o la tasa de fertilidad al parto tras el tratamiento con determinados agentes tóxicos o no tóxicos. También tienen relevancia los procesos de superovulación y el cultivo y transferencia de embriones. Al tratarse de una especie de ovulación inducida, en el momento de la inseminación artificial debe de inducirse la ovulación administrando un análogo

de la GnRH. La presencia de útero bipartito evita el paso de embriones de un útero a otro y por ende que se mezclen, por lo que a la hora de realizar transferencias de embriones pueden situarse en el mismo animal el tratado y el control para reducir lo máximo posible las diferencias que pudieran generarse de otra manera. Cabe destacar que la capacidad reproductiva completa en las hembras se alcanza alrededor de los 5-6 meses de edad y que a los 3 años empiezan a producirse descensos en el rendimiento reproductivo y problemas relacionados con la respuesta a gonadotropinas (Foote & Carney, 2000).

Adicional a lo previamente descrito, con respecto al uso del modelo en investigación biomédica, el surgimiento de técnicas de edición del genoma como la CRISPR/Cas9 o la microinyección nuclear permiten la obtención de conejos knockout o transgénicos capaces de servir como modelos de enfermedades humanas, que, a pesar de las limitaciones, ofrecen una gran oportunidad para generar y probar hipótesis en sistemas más simples (Kamaruzaman et al., 2013; Nishijima et al., 2021).

## 1.2 Congelación de semen

La criopreservación de semen presenta beneficios y aplicaciones en diversos ámbitos (Zhu et al., 2015). En el caso de la especie humana, constituye una herramienta básica de trabajo, ya que por un lado, las mujeres cuya preferencia sea ser madres solteras pueden recurrir a bancos de semen criopreservado para llevar a cabo inseminaciones artificiales, además, aquellas parejas que decidan atrasar la maternidad/paternidad pueden hacerlo gracias a esta preservación en el tiempo de los gametos, o en el caso de tener problemas de fertilidad, pueden recurrir técnicas como el ICSI o la fertilización *in vitro* (Baquer Minaei et al., 2012). Además de ser relevante para aquellas personas que padezcan enfermedades como el cáncer, dado que el tratamiento mediante quimioterapia o radioterapia puede afectar a la función testicular (Shehata & Chian, 2010).

En animales este procedimiento se utiliza tanto para la conservación y difusión de razas o líneas genéticas de gran valor en ganadería, como para la preservación de especies en peligro de extinción, presentando la ventaja de que la obtención de muestras seminales es mucho más asequible y fácil de realizar que la obtención de embriones (Mocé & Vicente, 2009).

La congelación permite la detención de manera indefinida de los procesos metabólicos de la célula espermática (Kuliková et al., 2015). Este estado se consigue tras alcanzar los  $-196^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que se encuentra el nitrógeno líquido, permitiendo así conservar la célula durante periodos muy largos de tiempo sin ningún tipo de actividad bioquímica (Chian, 2010). Sin embargo, la calidad seminal tras la criopreservación se ve afectada y generalmente se obtiene una viabilidad máxima de alrededor del 50-60 % en mamíferos (Curry, 2007).

Durante el proceso de congelación lo primero en convertirse en hielo es el agua situada alrededor de las células, debido a lo cual la concentración de solutos del líquido presente en el exterior celular aumenta. Se genera de esta manera un gradiente de concentración que provoca la salida de agua desde el interior de la célula, deshidratándola y afectando a la organización celular. Con el avance del proceso de congelación aumentan tanto el tamaño de los cristales de hielo como el gradiente de concentración, provocando a la ruptura de la membrana plasmática y la muerte celular (Chian, 2010). La formación de hielo intracelular, junto con la producción de especies reactivas del oxígeno, se consideran las principales causas de daño celular durante el proceso de congelación (Baquer Minaei et al., 2012; Rosato & Iaffaldano, 2013). No solamente la viabilidad se ve afectada, sino que la motilidad y la capacidad fecundante también se ven reducidas a causa de este proceso. La inseminación con estas muestras se ha visto que da lugar a menores tamaños de camada y tasas de fertilidad al parto (Kubovicova et al., 2021). Es importante entender que la gravedad de los daños producidos va a depender principalmente

del medio de congelación utilizado, la elección de crioprotectores y su concentración, el protocolo de congelación y descongelación utilizado, la concentración de oxígeno, la presencia de enzimas antioxidantes en el semen y su calidad inicial (Baquer Minaei et al., 2012; Viudes-de-Castro et al., 2014).

Dependiendo de la especie de la que provenga el semen, éste tendrá una susceptibilidad diferente al choque frío. Las diferencias que presentan tanto en morfología, tamaño, composición de fosfolípidos de membrana o metabolismo marcan las diferencias entre especies o incluso entre distintos machos de la misma especie (Curry, 2007; Kubovicova et al., 2021). Sin embargo, a lo largo del proceso de criopreservación existen pasos comunes a seguir. En primer lugar, se lleva a cabo la recolección del semen, ya sea mediante el uso de vaginas artificiales con animales entrenados, manipulación digital, electroeyaculación con animales salvajes o recuperación epididimaria. El siguiente paso consiste en la dilución de la muestra seminal tanto para ajustar la concentración como para reducir posibles efectos nocivos del plasma seminal. Se continúa con un enfriamiento de forma gradual en presencia de crioprotectores permeables y no permeables adecuados a la especie, y por último, se guarda en tanques con nitrógeno líquido hasta su posterior uso (Curry, 2007; Shehata & Chian, 2010).

### 1.3 Crioprotectores y diluyentes de congelación

Dentro de los muchos factores de los que depende el éxito de la criopreservación, la elección del medio de congelación junto con los crioprotectores adecuados tiene un papel destacable (Chian, 2010). Los crioprotectores tienen la capacidad, ante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, de reducir el estrés tanto físico como químico que sufren las células (Kuliková et al., 2015). Se clasifican según su capacidad de difusión a través de la membrana plasmática, generándose así dos grupos principales (Figura. 1): crioprotectores permeables capaces de difundir a través de la membrana, y crioprotectores no permeables, incapaces de atravesar la membrana (Sudagar et al., 2018). En conejo es común el uso combinado de un crioprotector permeable y uno no permeable para estabilizar la membrana plasmática, sin embargo, también puede darse el caso de que simplemente se use uno permeable (Mocé & Vicente, 2009).

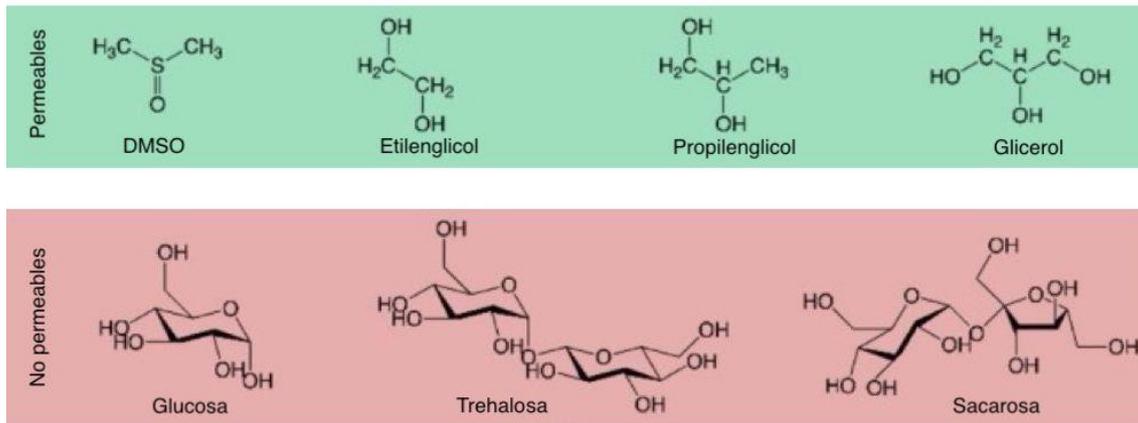
Los crioprotectores permeables se caracterizan por ser capaces de atravesar las membranas biológicas con facilidad y presentar una alta solubilidad en agua a bajas temperaturas (Whaley et al., 2021). La interacción que realizan mediante puentes de hidrógeno con el agua provoca una disminución del punto de congelación, y al darse esta situación, las moléculas de agua interaccionan menos entre ellas, disminuyendo la creación de nuevos núcleos de cristalización y con ello la formación de hielo (Whaley et al., 2021). Además de esta reducción del número y tamaño de los cristales, aumentan la fluidez de la membrana y deshidratan de manera parcial la célula (Rosato & Iaffaldano, 2013). A pesar de los beneficios, estos crioprotectores ejercen un efecto tóxico sobre la célula, cuya intensidad aumenta de manera directamente proporcional con el tiempo de exposición, concentración y temperatura (Chian, 2010). Se busca un balance entre protección y toxicidad ajustando las variables que influyen, dado que se necesita un tiempo mínimo para conseguir que penetre el crioprotector y se equilibren el medio intracelular y extracelular (Rosato & Iaffaldano, 2013). Con tal de reducir la exposición a la toxicidad, los crioprotectores pueden añadirse tras la fase de enfriamiento hasta 5°C (Curry, 2007).

Entre los crioprotectores permeables existentes destacan el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenglicol y etilenglicol (Whaley et al., 2021). El glicerol fue el primero en descubrirse, se trata de un compuesto incoloro e inodoro, de sabor dulce y textura viscosa. Además, presenta una baja toxicidad, es higroscópico y altamente soluble en agua gracias a los tres grupos hidroxilo que porta en su estructura (Chian, 2010). El DMSO es un compuesto soluble tanto en

disolventes orgánicos como en agua, incoloro y cuya cristalización se da a temperaturas inferiores a los 18,5°C. Dada su toxicidad, la combinación con otros agentes crioprotectores como el glicerol resulta interesante para reducir la concentración de DMSO en el medio de congelación (Awan et al., 2020; Chian, 2010). Tanto el etilenglicol como el propilenglicol, al tratarse de alcoholes con dos grupos hidroxilo, también son solubles en agua. Además, ambos son incoloros, inodoros, viscosos, dulces al gusto e higroscópicos, sin embargo, el etilenglicol es mucho más tóxico que el propilenglicol (Chian, 2010).

Dentro de la criopreservación de semen, el crioprotector permeable de elección para la mayoría de las especies es el glicerol (generalmente en un rango de concentración del 4-10%), pero en conejo se trata del DMSO, debido su sensibilidad a crioprotectores que porten grupos hidroxilo en su estructura (Curry, 2007; Viudes-de-Castro et al., 2014). La membrana plasmática de los espermatozoides de conejo posee un coeficiente de permeabilidad al agua bajo y una alta energía de activación, por lo que es preferible el uso de crioprotectores más permeables y de menor peso molecular que el glicerol (Kuliková et al., 2015). Además del DMSO (solo o en combinación con glicerol), en esta especie se han obtenido resultados interesantes en cuanto a calidad post-congelación del semen tras el uso de acetamidas como crioprotector permeable (Mocé & Vicente, 2009).

Los crioprotectores no permeables ejercen su acción desde el medio extracelular, dado que son incapaces de atravesar la membrana plasmática (Whaley et al., 2021). Por un lado, juegan un papel osmoprotector, eliminan el agua libre extracelular, aumentan la deshidratación de la célula e influyen tanto en la forma como en el tamaño de los cristales que se generan aumentando la supervivencia (Awan et al., 2020; Lucas et al., 2018). Además, poseen temperaturas de transición vítrea mayores que los crioprotectores permeables (Rosato & Iaffaldano, 2013). Por otro lado, la interacción que establecen con los grupos polares de los fosfolípidos o fosfoproteínas de membrana la estabilizan frente a los procesos de congelación y descongelación (Mocé & Vicente, 2009). Sin embargo, se necesita del uso adicional de crioprotectores permeables a bajas concentraciones para que se ejerza un efecto protector suficiente (Awan et al., 2020). En este grupo de crioprotectores se encuentran macromoléculas como los aminoácidos, proteínas o disacáridos (lactosa, sacarosa, trehalosa o rafinosa entre otros) (Rosato & Iaffaldano, 2013; Viudes-de-Castro et al., 2014). El uso preferente de disacáridos frente a monosacáridos como la glucosa se debe a la posible glicosilación no enzimática de las proteínas y lípidos celulares, y en consecuencia la alteración de funciones (Awan et al., 2020). Algunos polisacáridos de mayor peso molecular como el dextrano o el ficoll, objeto del presente estudio, también han ganado importancia al ejercer un efecto protector sobre las células espermáticas (Kuliková et al., 2015). El ficoll es un polisacárido relativamente inerte que presenta una alta solubilidad en agua y estructuralmente es esférico y compacto (Mao et al., 2018; Suarez et al., 1991). Su efecto crioprotector se ve reflejado en el trabajo de Kuliková et al. (2015), donde tanto la motilidad total como la progresiva y el número de acrosomas intactos es superior en el semen de conejo criopreservado con esta macromolécula. El dextrano es un polisacárido hidrofílico, biocompatible y estable, que al igual que el ficoll aporta viscosidad (Annu & Ahmed, 2021; Zarrintaj et al., 2020). El trabajo de Viudes-de-Castro et al. (2021) resalta el efecto crioprotector que ejerce el dextrano sobre la membrana acrosomal de los espermatozoides de conejo durante el proceso de congelación y descongelación.



**Figura. 1** Estructura de algunos crioprotectores permeables y no permeables utilizados durante los procesos de criopreservación (Weng et al., 2019).

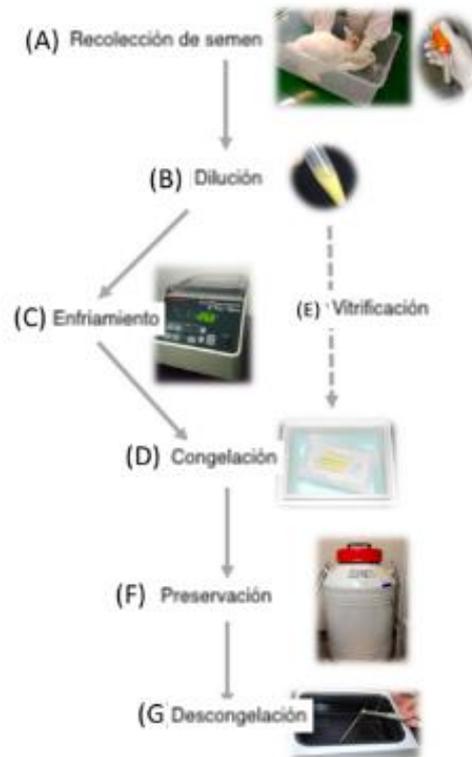
En lo que se refiere al diluyente base utilizado en los medios de congelación de semen, generalmente el más usado en conejo es el compuesto por Tris-ácido cítrico-glucosa/fructosa (Mocé & Vicente, 2009). El papel principal de esta mezcla es regulatorio, tanto del pH como de la osmolaridad, pero también se encarga de aportar una fuente de energía y de contener a los crioprotectores (permeables y no permeables) (Curry, 2007). La adición de yema de huevo al diluyente es una práctica común, sin embargo, al ser un producto de origen animal presenta inconvenientes, como la variabilidad en su composición y el riesgo de introducción de patógenos, por ello se prefiere el uso de polímeros sintéticos (Viudes-de-Castro et al., 2021). La adición de detergentes, en algunos casos favorece la interacción entre la yema de huevo y el espermatozoide protegiendo así la integridad acrosomal, pero tienen un efecto negativo sobre la fertilidad (Mocé & Vicente, 2009). Por otra parte, la presencia de microorganismos en el plasma seminal tras la recolección puede también afectar a la fertilidad, por lo que se añaden antibióticos al diluyente (Curry, 2007).

#### 1.4 Protocolos de congelación y descongelación

A lo largo del proceso de criopreservación el semen se ve sometido a diferentes factores estresantes tales como la disminución de temperatura, la formación de hielo, la presencia de crioprotectores y el incremento de la osmolaridad, que van a tener un efecto negativo tanto sobre la calidad final del semen como sobre su capacidad fecundante *in vivo* (Moce et al., 2015; Mocé & Vicente, 2009). Por ello, la elección de un protocolo de congelación y descongelación adecuado va a ser determinante en la supervivencia y estado post-congelación de los espermatozoides. Es necesaria la adaptación del protocolo a la especie con la que se trabaja, ya que, la composición de la membrana plasmática junto a otros factores da lugar a que unas especies sean más resistentes o sensibles al proceso que otras (Mocé & Vicente, 2009). En conejo, sin embargo, al igual que ocurre con los componentes del medio de congelación, no se ha llegado a un consenso en cuanto a cuál es el mejor protocolo, es decir, no existe una “gold standard technique” (Mocé & Vicente, 2009; Shehata & Chian, 2010). Además, la diversidad de protocolos entre autores que buscan una optimización de la criopreservación dificulta mucho la comparación entre trabajos (Mocé & Vicente, 2009). Lo que sí queda claro es que, en líneas generales, con estos protocolos no se consigue llegar al mismo nivel de fertilidad y prolificidad que se llega con el semen fresco (Mocé et al., 2002).

A pesar de no existir unanimidad en cuanto a los detalles del protocolo, las fases por las que pasa el semen son comunes en todos. Existe una fase de enfriamiento, una de congelación y

otra de descongelación. Además, según la velocidad a la que se lleva a cabo la bajada de temperatura se trata, o bien de una congelación lenta, o bien de una vitrificación (Figura. 2). En el caso de la congelación lenta sí se forman cristales de hielo y se utilizan crioprotectores a bajas concentraciones, mientras que durante la vitrificación la velocidad de bajada es tan elevada que se pasa directamente a un estado vítreo sin la formación de cristales de hielo y la concentración de crioprotectores usada es mucho más elevada (Rosato & Iaffaldano, 2013). En el ámbito de la criopreservación de semen de conejo la técnica más extendida es la congelación lenta (Nishijima et al., 2021).



**Figura. 2** Esquema del proceso de criopreservación de semen de conejo mediante congelación lenta o vitrificación (Nishijima et al., 2021).

El primer paso es la recolección de la muestra seminal y su dilución a temperatura ambiente con el medio de congelación, consiguiendo así una concentración o una dilución determinadas (Shehata & Chian, 2010). Los crioprotectores permeables suelen estar ya contenidos en el medio de congelación en este momento, pero en el caso de usar de manera adicional glicerol, éste generalmente se añade tras el paso de enfriamiento hasta 5°C y conlleva un periodo adicional de equilibrado a esa temperatura (Mocé & Vicente, 2009). Respecto al empaquetado del semen, la mayoría de los autores lo llevan a cabo mediante pajuelas de plástico de 0,25 o 0,5 ml (Mocé & Vicente, 2009).

Durante la fase de enfriamiento se disminuye la temperatura hasta los 5°C (Nishijima et al., 2021). En algunos mamíferos, este descenso puede generar un choque frío si se realiza de manera brusca, dando como resultado una menor viabilidad y motilidad y teniendo efectos sobre la morfología acrosomal (Curry, 2007; Maeda et al., 2012). Sin embargo, la composición lipídica de los espermatozoides de conejo permite un descenso de la temperatura más rápido de lo habitual. Así, Móce et al., (2010) no encontraron diferencias significativas entre el semen enfriado a mayor y menor velocidad, mientras que Maeda et al., (2012) obtuvo peores

resultados con velocidades de enfriamiento mayores. A pesar de esto, el proceso de enfriamiento no parece ser la fase crítica y más perjudicial del proceso de criopreservación (Mocé et al., 2002). La duración de esta fase varía entre autores, pero va desde los 90 min a las 2 h, aunque hay protocolos más rápidos descritos (Mocé & Vicente, 2009; Viudes-de-Castro et al., 2021). Algunos autores incluyen un periodo de estabilización a 5°C, en conejo se ha visto como este periodo favorece tanto la calidad como la capacidad fecundante del semen criopreservado, mientras que en otras especies no tiene ningún efecto beneficioso o incluso éste es negativo (Curry, 2007; Nishijima et al., 2021).

En la fase de congelación el descenso de temperatura suele realizarse con congeladores automáticos programables que la disminuyen de manera controlada y lineal o colocando las pajuelas a una altura determinada del nitrógeno líquido para que el vapor del nitrógeno las enfríe (Curry, 2007). Esta última es la más extendida, no solo por ser más económica, sino también por ser más eficiente (Moce et al., 2015). Existe variabilidad entre protocolos respecto al tiempo de aplicación y la altura a la que se colocan las pajuelas del nitrógeno, pero habitualmente el tiempo ronda los 10 min y se sitúan a 5 cm de la superficie (-125/-130°C) (di Lorio et al., 2018; Moce et al., 2015; Viudes-de-Castro et al., 2021). Finalmente, se introducen en el nitrógeno líquido que se encuentra a -196°C y se almacenan (di Lorio et al., 2018). A diferencia de la anterior fase, esta sí genera importantes efectos perjudiciales sobre la capacidad fecundante y la calidad de los espermatozoides (Moce et al., 2015).

La fase de descongelación suele realizarse sumergiendo las pajuelas en agua a temperaturas cercanas a la corporal (37-39°C), aunque tanto éstas como el tiempo que se sumergen varía entre protocolos (Mocé & Vicente, 2009). El uso de temperaturas mayores durante menos tiempo generalmente ofrece mejores resultados, probablemente debido a la disminución de la recristalización que se da en las células criopreservadas (Nishijima et al., 2021). La descongelación a 50°C durante 10-12 segundos es recurrente entre autores, pero la temperatura adecuada va a depender de diversos factores, incluyendo entre estos los protocolos de enfriamiento y congelación (di Lorio et al., 2018; Iaffaldano et al., 2012; Mocé et al., 2003; Nishijima et al., 2021; Viudes-de-Castro et al., 2021).

## 1.5 Cambios estructurales del espermatozoide durante la congelación

La calidad seminal, junto con la capacidad fecundante, se puede ver alterada a lo largo de todo el proceso de criopreservación, desde el momento en el que el semen se diluye con el medio de congelación hasta su descongelación, a pesar de que algunos pasos sean menos dañinos que otros (Watson, 1995). El estrés mecánico, térmico, osmótico y químico al que se ven sometidos los espermatozoides va a generar cambios a nivel de motilidad, viabilidad, actividad mitocondrial, integridad de la membrana acrosomal y de la membrana plasmática, estado del ADN y capacidad fecundante (Ahmad et al., 2015; Ezzati et al., 2020; Shehata & Chian, 2010; Whaley et al., 2021). Destaca el aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) que se producen a consecuencia de la criopreservación, dado que este estrés oxidativo es una de las principales fuentes de daño celular (Baquer Minaei et al., 2012). Su producción a bajas concentraciones es relevante para la adquisición de la capacidad fecundante y el normal funcionamiento espermático, sin embargo, un exceso de ROS se relaciona con la peroxidación lipídica, daños del ADN, disminución de la actividad mitocondrial, incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática, pérdida de la motilidad y muerte celular (Cheuquemán et al., 2018; de Lamirande et al., 1997; Ezzati et al., 2020; Peris et al., 2007).

Las membranas plasmática y acrosomal ven severamente afectada su estructura y funcionalidad con los cambios de temperatura (Shehata & Chian, 2010). Los cambios de fase producidos en

los lípidos no son totalmente reversibles tras el proceso de congelación-descongelación. La ruptura de la asimetría de la bicapa junto con la alteración de la funcionalidad de algunas proteínas integrales, como los canales de iones, generan un aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática (Watson, 2000). Este aumento de permeabilidad da lugar a una entrada de calcio desregulada similar a la que se produce durante la capacitación espermática, además, la inestabilidad de la membrana resulta en reacciones acrosómicas prematuras que acortan mucho la vida media del espermatozoide (Watson, 1995).

Referente a la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles se ve reducido tras el proceso. Además, aquellos en los que se detecta movimiento se caracterizan por tener una velocidad y linealidad reducidas al compararse con el semen fresco (Watson, 1995). El estrés oxidativo junto con la disminución de la actividad mitocondrial son los principales responsables de esto (Ahmad et al., 2015). La mitocondria es una de las estructuras más sensibles a la criopreservación, los cambios sobre su membrana disminuyen su capacidad de producción de ATP, afectando así de manera directa a la motilidad espermática (Cheuquemán et al., 2018).

La viabilidad generalmente disminuye hasta el 50% o incluso más, a pesar de la utilización de protocolos optimizados (Watson, 2000). Los cambios de volumen que sufre la célula durante la criopreservación y la formación de hielo intracelular son potencialmente letales para esta (Gilmore et al., 1998; Watson, 2000). Sin embargo, no son los únicos cambios responsables de la baja supervivencia de los espermatozoides, ya que los daños sobre las membranas, la producción de ROS y el resto de los efectos de la criopreservación previamente comentados también lo son.

## 1.6 Efecto de la congelación sobre la capacidad fecundante del semen

Los efectos de la congelación sobre la capacidad fecundante no son igual de severos para todas las muestras seminales, existen machos cuyo semen congela mejor que el de otros (Mocé & Vicente, 2009). A pesar de esto, generalmente tras el proceso de criopreservación la calidad seminal, la motilidad y la vida media se reducen, lo cual justifica la menor fertilidad y prolificidad del semen criopreservado frente al fresco tras la inseminación artificial (Mocé et al., 2003). Al depositar el semen al nivel del cuello del útero, el recorrido que tienen que llevar a cabo es extenso y la gran mayoría no llegan al reservorio oviductal (istmo), bien porque mueren por el camino y son fagocitados, o porque son incapaces de avanzar debido a su comprometida motilidad (Watson, 2000). Además, debido a los cambios irreversibles que se dan en la membrana plasmática, la capacidad de interacción con el epitelio oviductal se puede ver alterada (Watson, 2000). Con tal de contrarrestar parcialmente el efecto de la congelación, en muchas especies la inseminación suele realizarse con un mayor número de espermatozoides que cuando se efectúa con semen fresco (Watson, 1995).

## 2. OBJETIVOS

Los crioprotectores tienen un papel fundamental en la eficacia de los medios de congelación, tanto es así, que su elección influye en la supervivencia y funcionalidad de los espermatozoides tras el proceso de criopreservación. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto crioprotector de dos polisacáridos no permeables de igual peso molecular pero distinta conformación espacial, el Dextrano-70 y el Ficoll-70, cuando se añaden a un medio de congelación que contiene DMSO como crioprotector permeable y sacarosa como crioprotector no permeable. Se evaluarán las diferencias tanto de calidad seminal *in vitro* como de capacidad fecundante *in vivo*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño experimental

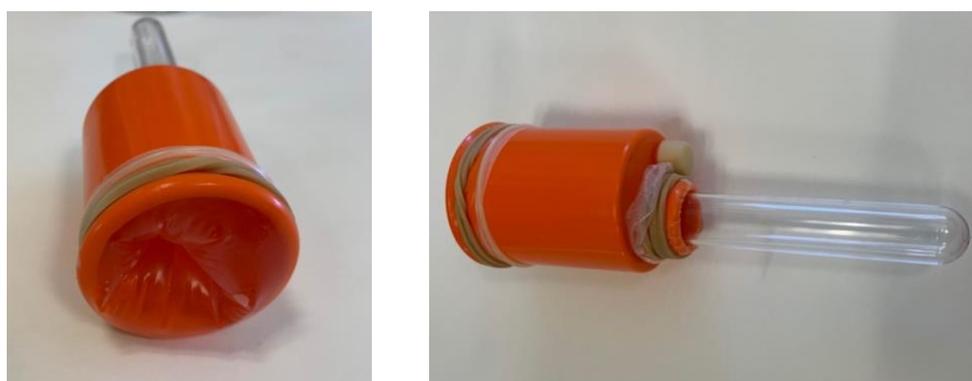
En el presente trabajo se llevaron a cabo dos experimentos, el primero en las instalaciones experimentales del Centro de Investigación y Tecnología Animal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias(CITA-IVIA), donde se congelaron 8 muestras seminales con cada medio y se hizo la evaluación *in vivo* de la capacidad fecundante del semen criopreservado mediante inseminación artificial de la mitad de ellas, mientras que el segundo experimento se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV), donde se realizaron los ensayos biológicos *in vitro* para evaluar la sensibilidad a la capacitación de los espermatozoides criopreservados de 7 de las muestras congeladas con cada medio.

#### 3.2 Animales

Todos los animales utilizados fueron de origen neozelandés. Se utilizaron 12 machos adultos para la obtención de las muestras de semen, 165 hembras para llevar a cabo las inseminaciones artificiales y 4 hembras para el desarrollo de las pruebas biológicas.

#### 3.3 Recuperación del semen

La obtención de las muestras seminales se llevó a cabo mediante vagina artificial, dispositivo que consiste en un cuerpo cilíndrico rígido con dos aberturas en los extremos (Figura. 3) que se recubre interiormente con una camisa de látex para generar una cámara cerrada, que se rellenará con agua caliente con el fin de proporcionar la presión y temperatura necesarias para estimular la eyaculación del macho. En uno de los extremos de la vagina artificial se sitúa el tubo colector, mientras que el otro es el punto de entrada del pene. Cada macho tenía asignada una vagina artificial, por lo que cada eyaculado se recolectó por separado. Además, en cada sesión de trabajo se obtenían dos eyaculados por macho, con un intervalo de tiempo entre extracciones de 30 min aproximadamente. La recogida de muestras se realizó una vez por semana durante dos meses.



**Figura. 3** Vagina artificial preparada para la recolección de semen con el recubrimiento de látex, el tubo recolector y el agua a 50°C.

Tras la recogida de las muestras, estas se transportaron al laboratorio protegidas de la luz y evitando cambios bruscos de temperatura en el interior de una caja de material aislante. Una vez en el laboratorio, cada eyaculado se examinaba individualmente para determinar si eran

aptos para formar parte de la mezcla heteroespérmica que se iba a proceder a congelar. Se descartaron aquellas muestras que presentaban un color amarillento debido a la presencia de orina y se eliminaron los tapones mucosos. Se mezclaron aquellas muestras que presentaban una coloración blanca nacarada y una motilidad estimada superior al 70%. De la mezcla heteroespérmica se tomó una alícuota para evaluar las características de calidad en fresco y con el resto de la mezcla se inició el protocolo de congelación que se describe más adelante, para finalmente almacenar las muestras congeladas en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. Cada mezcla heteroespérmica recibió el nombre de su sesión de trabajo, marcándose en los tubos de cada sesión antes de su almacenamiento.

### 3.4 Evaluación del semen

#### *3.4.1 Concentración*

La determinación del número de espermatozoides por mililitro se realizó en todas las mezclas heteroespérmicas en fresco. Para ello se realizó una dilución 1:50 con una solución de glutaraldehído al 0,25%. Tras esto, la muestra fijada se cargó en una cámara Thoma Zeiss (Marienfeld, Alemania) que permaneció en reposo durante 2 minutos para permitir que todos los espermatozoides se situasen en el mismo plano de visión. A continuación, se procedió al recuento en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) con contraste de fases a 400X aumentos.

#### *3.4.2 Normalidad, gota citoplasmática y porcentaje de acrosomas reaccionados*

Las determinaciones del porcentaje de normalidad y gota citoplasmática se realizaron solo en las muestras frescas dado que, al igual que la concentración, se trata de parámetros invariables con la congelación. Se utilizó la muestra fijada preparada para el recuento de concentración. Se tomaron gotas de 10 µl, se situaron sobre un portaobjetos limpio y se colocó el cubreobjetos. Preparada la muestra, pasó a evaluarse en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) con contraste de fases a 400X aumentos. Se evaluaron como mínimo 200 espermatozoides y se calculó el porcentaje de espermatozoides con características normales.

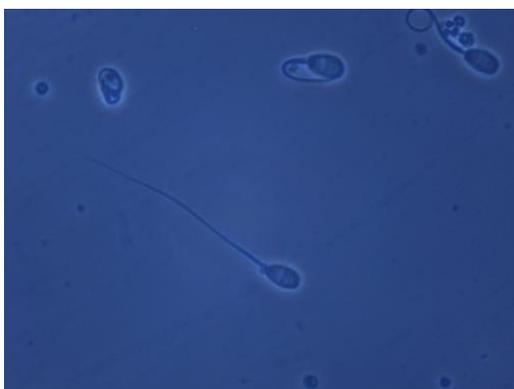
La gota citoplasmática es una alteración morfológica frecuente, indicativa de inmadurez por parte de los espermatozoides debido a que no se ha completado el proceso de espermatogénesis (Axné, 2006), por lo que resulta de interés su evaluación. El procedimiento seguido corresponde con el de evaluación de la normalidad previamente descrito, con la diferencia de que en este caso lo que se está determinando es el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática, ya sea distal o proximal.

La evaluación de los acrosomas reaccionados mediante microscopía permitió adquirir una idea a grandes rasgos del estado inicial del acrosoma de la muestra, dado que posteriormente se llevaron a cabo evaluaciones más exhaustivas mediante citometría de flujo. El procedimiento seguido corresponde con el de evaluación de la normalidad previamente descrito. En este caso, lo que se está determinando es el porcentaje de espermatozoides que no han sufrido reacción acrosómica. Este parámetro sí es variable tras el proceso de congelación-descongelación, por lo que la evaluación mediante citometría de flujo se realizó tanto en las muestras frescas como en las descongeladas.

### 3.4.3 HOST

El análisis de la funcionalidad de las membranas de los espermatozoides se realizó a las muestras frescas. Para ello se llevó a cabo una prueba hipoosmótica o HOST (Hypo-Osmotic Swelling Test) con una solución de 75 mOsm con fructosa y ácido cítrico. Esta prueba se basa en que cuando los espermatozoides se exponen a medios hipoosmóticos, aquellos que presentan una membrana funcional permiten el paso de líquido al espacio citoplasmático y el choque hipoosmótico provocará un enrollamiento de la cola.

La muestra de semen a evaluar se diluyó 1:20 con la solución hipoosmótica previamente mencionada y se mantuvo en incubación a 37°C para que las membranas reaccionaran a este estrés. Transcurridos 30 minutos se añadieron 50 µl de una solución de glutaraldehído al 0,25% para fijar la muestra y se procedió a su evaluación (Figura 4), para lo cual se colocaron 10 µl de muestra fijada en un portaobjetos y, una vez colocado el cubreobjetos, pasó a observarse a 400X aumentos en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) con contraste de fases. Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra y se calculó el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional.



**Figura. 4** Espermatozoides de la zona superior de la imagen con cola enrollada debido a la respuesta generada por el medio hipoosmótico y espermatozoide central con cola completamente estirada por falta de respuesta de la membrana.

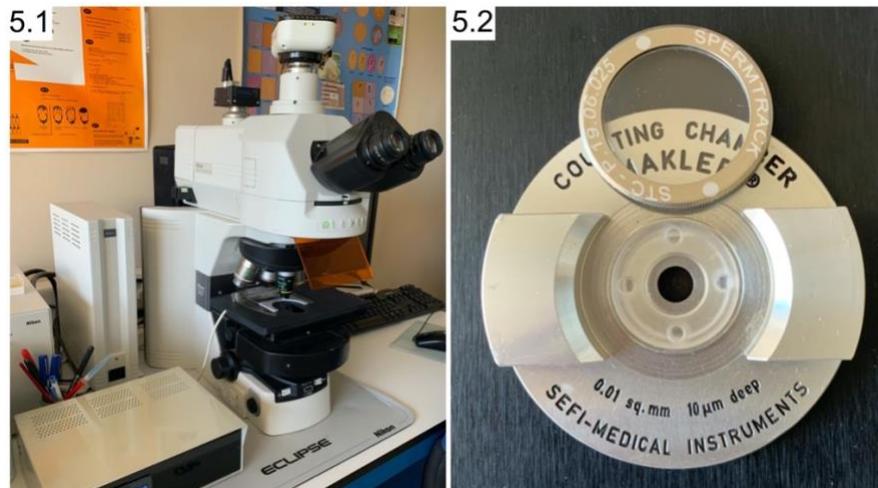
### 3.4.4 Motilidad

La motilidad se evaluó tanto en el semen fresco como en el descongelado mediante un sistema computarizado de análisis de imagen (CASA, ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) con un set-up específico para semen de conejo, dado que se trata de un método objetivo y automatizado que permite obtener información precisa sobre la cinética de los espermatozoides.

La muestra se ajustó a 15 millones de espermatozoides/ml con el diluyente Tris-ácido cítrico-glucosa (TCG) atemperado en una placa térmica y suplementado con 2 g/l de seroalbúmina bovina (BSA). Una vez diluida, se colocaron 5 µl de ésta sobre una cámara Makler (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel) atemperada para no afectar a la motilidad y se pasó a la evaluación mediante un microscopio Nikon Eclipse E300 (Nikon Corporation Instrument Co., IZASA, Barcelona, España) observando a 100X aumentos y en contraste de fases negativa (Figura. 5). Se capturaron 5 vídeos de 25 imágenes por segundo para cada muestra y, posteriormente, este material fue corregido manualmente con el sistema CASA eliminando así todas aquellas trayectorias erróneas y partículas captadas como espermatozoides. Esto se debe a que el programa hace una detección automática inicial de los espermatozoides y las trayectorias, pero

en el semen de conejo, debido a la gran cantidad de partículas que presenta, el sistema de detección automática no funciona a la perfección, por lo que se deben eliminar manualmente las partículas de las imágenes grabadas.

Se registraron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, considerándose como no móvil aquel espermatozoide cuya velocidad media en el trazado (VAP) era inferior a  $10 \mu\text{m/s}$  y como progresivo aquel cuya VAP era superior a  $50 \mu\text{m/s}$  y cuyo índice de rectitud (STR) era superior o igual al 70%.



**Figura. 5** Microscopio Nikon Eclipse E300 utilizado durante la evaluación de la motilidad de las muestras (5.1) y cámara Makler (5.2).

### 3.4.5 Viabilidad y daños en el acrosoma

Esta valoración se realizó tanto en semen fresco como en descongelado. Los análisis de citometría de flujo para evaluar la viabilidad y la integridad del acrosoma se realizaron con un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter, Inc) equipado con láser rojo (638 nm), azul (488 nm) y violeta (405 nm) (Figura. 6). El citómetro se calibró diariamente utilizando esferas de calibración específicas proporcionadas por el fabricante. En cada valoración se recogieron datos de 10000 eventos.

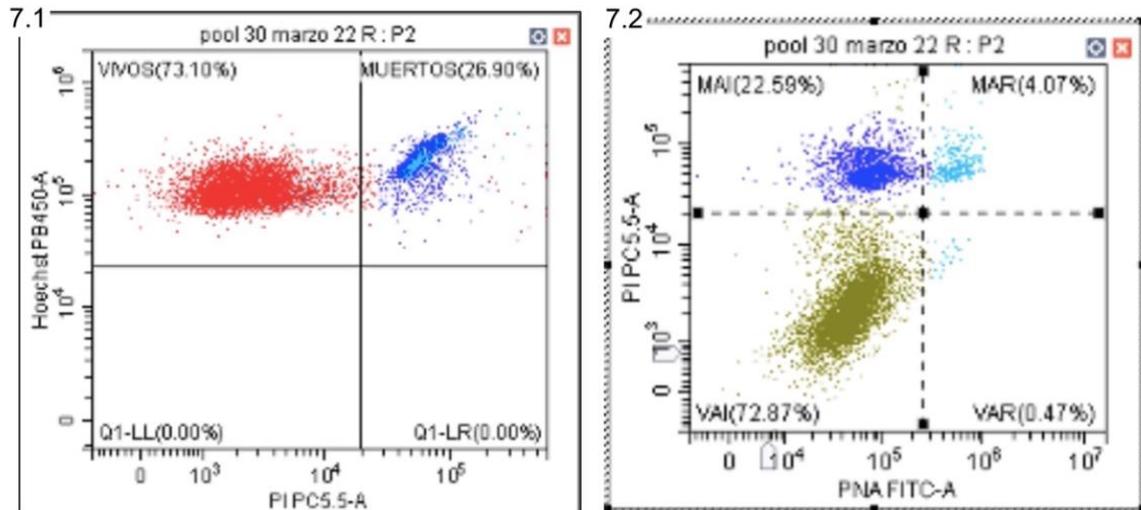


**Figura. 6** Citómetro de flujo CytoFLEX utilizado durante el análisis de viabilidad y evaluación del estado del acrosoma equipado con su depósito de agua destilada y de residuos.

La tinción con Hoechst 33342 permite seleccionar la población de espermatozoides, eliminándose los eventos no espermáticos. Por otra parte, mediante un gráfico que permite contabilizar únicamente los eventos simples presentes en un área (puerta de eventos simples), se excluyeron otro tipo de partículas de los análisis (como dobletes, aglomeraciones y partículas no espermáticas). Por su parte, el yoduro de propidio (PI) sólo es capaz de penetrar en aquellas células cuya membrana se encuentre fragmentada (espermatozoides muertos). Por último, la utilización de la lectina PNA conjugada con el FITC, al ser específica de la membrana externa acrosomal, permite evaluar los daños presentes sobre esta estructura, ya que la ausencia de fluorescencia en los espermatozoides es indicativa de un acrosoma intacto. Por ello, se utilizó una triple tinción FITC-PNA/PI/Hoechst para determinar la viabilidad espermática y la integridad del acrosoma.

Para realizar la tinción se tomaron 100 µl de semen a  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL a los que se añadieron 0,5 µl de Hoechst 33342 (0,5 mg/mL) durante 20 minutos a 37°C en oscuridad. Posteriormente, se añadieron 1,5 µl de FITC-PNA (1 mg/mL) y 0,5 µl de PI (1 mg/mL) y se incubó la muestra otros 10 min en las mismas condiciones, tras lo cual, se adicionaron 400 µl del diluyente TCG para obtener una concentración final de  $6 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

A continuación, se analizó la muestra en el citómetro, pudiéndose observar diferentes poblaciones. En el gráfico donde se representaba la población teñida con Hoechst 33342 frente a la teñida con PI (Figura. 7.1), se mostraban los valores la viabilidad de la muestra, mientras que en el gráfico donde se representaba el PI frente al FITC-PNA (Figura. 7.2) se podía observar la población de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI: PI negativo, FITC-PNA negativo), la de muertos con acrosoma intacto (MAI: PI positivo, FITC-PNA negativo), vivos con acrosoma reaccionado (VAR: PI negativo, FITC-PNA positivo) y muertos con acrosoma reaccionado (MAR: PI positivo, FITC-PNA positivo).



**Figura. 7** Representaciones gráficas de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en combinación con tinción con Hoechst 33,342, yoduro de propidio y FITC-PNA de una muestra de semen fresco. En 7.1) se presenta Hoechst 33342 vs PI y en 7.2) se presenta PI vs FITC-PNA.

#### 3.4.6 Test biológico

Con tal de evaluar la sensibilidad a la capacitación de espermatozoides criopreservados utilizando cada molécula de estudio (Ficoll-70 o Dextrano-70) se realizó un test biológico consistente en un co-cultivo de los espermatozoides con las células oviductales de conejo. A la

hora de evaluar, se tuvo en cuenta el número de espermatozoides/cm<sup>2</sup> adheridos sobre la placa tras realizar el lavado final.

#### **Tratamiento de las placas de co-cultivo:**

Se realizó un recubrimiento de las placas con gelatina de porcino con tal de mejorar la adherencia de las células a cultivar. Se prepararon 50 ml de gelatina utilizando PBS 1X y 0,5 g de gelatina de porcino en un Erlenmeyer de 50 ml. La mezcla se fue agitando y calentando hasta la total homogeneización y una vez estuvo completamente transparente se fueron depositando 0,2 ml de la solución en los 4 pocillos de cada una de las 16 placas NUNC utilizadas. Las placas se mantuvieron 2 horas a 37°C con la gelatina y una vez transcurrido ese periodo se retiró la solución mediante aspiración y se conservaron en refrigeración hasta su posterior uso.

#### **Preparación del medio de cultivo básico:**

Se prepararon 100 ml de medio de cultivo básico compuesto por DMEM / Ham's F12, 15 mM de HEPES y suplementado con dos antibióticos, penicilina a 100 U/ml y estreptomina a 100 µg/ml. Esta adición de antibióticos resulta importante dada la gran facilidad que presenta el cultivo de células epiteliales para contaminarse.

#### **Preparación del suero de coneja:**

Antes de preparar el medio de cultivo para células epiteliales fue necesaria la obtención de suero de coneja en celo. Se utilizaron 2 conejas para la recuperación de 60 ml de sangre, previo a la extracción los animales fueron sedados mediante la administración vía subcutánea de 16 mg/kg de hidrocloreuro de xilacina (Xilagesic, Carlier) y 9mg/kg de hidrocloreuro de ketamina (Ketamidor, Ritcher Pharma). Una vez sedados, se desinfectó la región de la vena de la oreja y se introdujo una cánula que permitió que la sangre comenzara a recolectarse en el interior de un frasco estéril situado al final de esta. Tras la obtención, se dejó coagular la sangre durante 1 hora a 5°C y pasado ese periodo se recogió el suero bruto, se centrifugó a 400 rpm durante 10 min a 5°C y se recuperó el sobrenadante. El suero procedente del sobrenadante fue detoxificado mediante tratamiento térmico en baño María a una temperatura de 56°C durante 30 min.

#### **Preparación del medio de cultivo de epiteliales:**

Se prepararon 100 ml de medio de cultivo añadiendo 90 ml del medio básico preparado previamente, un 10% del suero de coneja en celo (10 ml), 10 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina y 25 ng/ml de EGF. Una vez preparado el medio, se guardó en refrigeración hasta su posterior uso.

#### **Obtención de ROECs y establecimiento del cultivo primario:**

Se sacrificaron dos hembras de conejo en celo y se recuperaron los tractos reproductivos (Figura 8.1). Los oviductos fueron aislados, retirándose toda la grasa sobrante mediante la realización de pequeños cortes con las tijeras (Figura 8.2). Una vez limpios y aislados, se procedió a la apertura en canal (Figura 8.3 y 8.4) del oviducto con el fin de que la digestión enzimática posterior fuese más efectiva.

A continuación, el tejido oviductal se sumergió en PBS 1X suplementado con antibióticos y antimicóticos durante 30s, y se repitió el proceso una segunda vez, tras lo cual se sumergió en una solución con alcohol de 70 grados durante 10s tres veces y finalmente se volvió a introducir

en una solución de PBS 1X. Este proceso permitió lavar el tejido y reducir al máximo la contaminación.

Una vez realizados los lavados, los oviductos se sometieron a digestión enzimática con una solución de tripsina al 1% en medio DMEM / Ham's F12 con 15 mM de HEPES durante 1h a 37°C. Tras la digestión se pasaron por vórtex a máxima velocidad durante 30s 3 veces y la solución resultante se filtró con una malla de nylon de 120 µm tratada con alcohol y PBS. Este filtrado que contenía las células y bloques de células disgregados se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y, tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo de epiteliales filtrado.



**Figura. 8** 8.1) Útero de coneja extirpado con corte realizado a la altura del istmo para aislar el oviducto. 8.2) Ovario y oviducto tras retirar toda la grasa circundante. 8.3) Apertura en canal del oviducto introduciendo la punta de las tijeras por el infundíbulo y cortando a lo largo de todo el canal. 8.4) Epitelio oviductal desplegado y totalmente expuesto para facilitar la digestión enzimática.

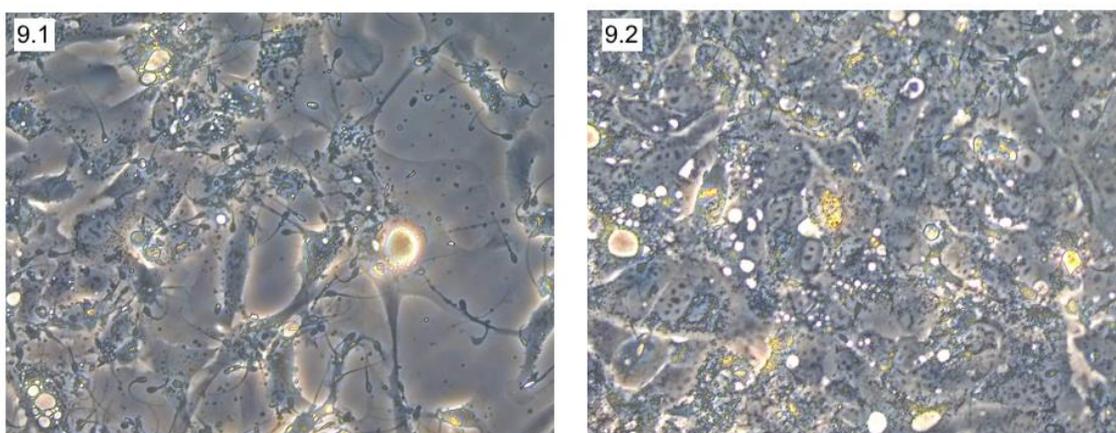
#### **Cultivo de epiteliales:**

Para establecer el cultivo de células epiteliales oviductales se añadieron 500 µl de medio de cultivo de epiteliales a cada uno de los 4 pocillos de las 16 placas NUNC tratadas con gelatina mediante una jeringuilla acoplada a un filtro de 0,22 µm. A continuación, se añadieron 150 µl de la suspensión de células y se cultivaron durante 24 h a 38°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad a saturación. Pasadas las 24h se aspiró el contenido de las placas, se lavaron dos veces con 0,5 ml de medio y se añadieron 500 µl nuevos de medio de cultivo. Las placas se dejaron incubando hasta que las células consiguieron cubrir la totalidad de la superficie (48-72 h).

### Test de adherencia:

Para realizar el test de adherencia, de cada una de las sesiones de congelación y medio de congelación, se descongeló una pajuela y se cogió el volumen correspondiente a 100 millones de espermatozoides. Este volumen se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y posteriormente se retiró el sobrenadante. Sobre el pellet formado se añadieron cuidadosamente 200  $\mu$ l de medio condicionado por el cultivo de las células epiteliales con el fin de realizar un Swim-up de 45 min de duración a una temperatura de 38°C y con inclinación de 45°.

Efectuado el Swim-up, 25  $\mu$ l de la suspensión y se añadieron al pocillo de la placa NUNC con el cultivo de células epiteliales. Para cada sesión y medio de congelación se realizaron tres réplicas, generándose así un total de 42 pocillos a evaluar. Tras la co-incubación de 30 min se descartó el medio presente en el pocillo, se realizó un lavado con 250  $\mu$ l de medio nuevo y por último se añadieron 100  $\mu$ l para observar a través del microscopio el número de espermatozoides adheridos (Figura. 9). Con los datos obtenidos del recuento se determinó el número de espermatozoides adheridos por  $\text{cm}^2$  teniendo en cuenta que el aumento utilizado en el microscopio era de 200X y el campo que se visualizaba correspondía a un área de 0,754  $\text{cm}^2$ .



**Figura. 9** Tapiz de células epiteliales del oviducto de conejo tras la incubación con las muestras de semen criopreservadas con 9.1) Dextrano y 9.2) Ficoll.

### 3.5 Composición de los diluyentes de congelación

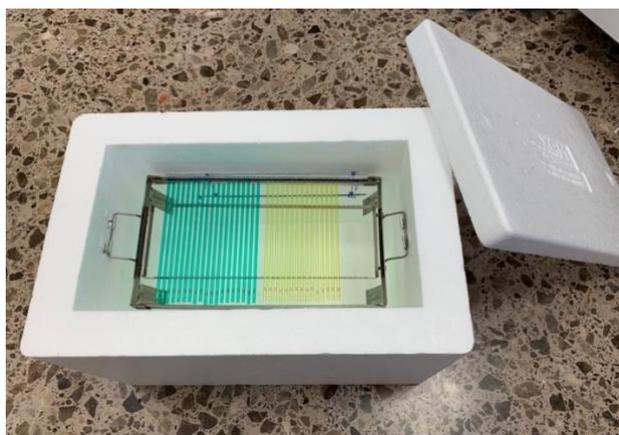
Para poder evaluar el efecto del dextrano y el ficoll en el medio de congelación del semen se utilizó el diluyente de congelación definido en 1996 por el grupo de investigación (Vicente & Viudes-de-Castro, 1996) que consiste en el diluyente base TCG suplementado con 0,1M de sacarosa como crioprotector no permeable y 3,5M de  $\text{Me}_2\text{SO}$  (DMSO) como crioprotector permeable, al cual se añadía un 10% de Ficoll-70 o Dextrano-70. La concentración final de crioprotectores en las mezclas de semen fue de 1,7% de sacarosa, 12,4% de DMSO y 5% de la macromolécula correspondiente.

### 3.6 Procedimiento de congelación

Cada mezcla heteroespérmica se dividía en dos fracciones iguales, cada una de las cuales se congeló con uno de los medios de congelación experimentales. Para ello, se realizó una dilución 1:1 con el medio de congelación correspondiente. A continuación, se cargaron las pajuelas de plástico de 0,5 ml (MINITÜB, Labortetechnik GmbH y Co., Tiefenbach, Alemania) aspirando con una jeringuilla acoplada al extremo de la pajuela que presenta el tapón de seguridad, y una vez

cargadas, el otro extremo se selló con alcohol polivinílico (IMV TECHNOLOGIES, Saint Ouen sur Iton, Francia). Se utilizaron pajuelas de diferentes colores para cada tratamiento.

Realizado este proceso, las pajuelas se colocaron sobre una gradilla metálica y se pusieron a refrigerar 45 min a 5°C. Transcurridos los 45 min, la gradilla se colocó a 5 cm de la superficie del nitrógeno líquido (110°C) en una caja de poliestireno expandido (Figura. 10). La caja se cerró y estas condiciones se mantuvieron durante 10 min. Tras lo cual las pajuelas se sumergieron en nitrógeno líquido, y se guardaron en tubos marcados con el tipo de diluyente utilizado y la sesión correspondiente y se almacenaron en el banco de semen hasta su posterior evaluación y uso.



**Figura. 10** Caja de poliestireno con nitrógeno líquido utilizada durante el proceso de congelación de las pajuelas.

### 3.7 Procedimiento de descongelación

Las pajuelas congeladas se colocaban en un vaso Deward con nitrógeno líquido y con ayuda de unas pinzas se sumergían en un baño María a 50°C durante 10 segundos mientras se agitaban vigorosamente. Para recuperar el semen se cortó primero el extremo con el tapón de PVA y posteriormente el del tapón de seguridad, para verter todo el contenido en un tubo Falcon de 10 ml.

### 3.8 Inseminación artificial

Con el fin de evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides, se realizaron inseminaciones artificiales para obtener valores de tasa de fertilidad al parto y de prolificidad. Dos días antes de la inseminación de las hembras éstas se sincronizaron con 12 UI de gonadotrofina sérica equina (Cuniser 500, Laboratorios Hipra, Girona, España) mediante inyección subcutánea. El día de las inseminaciones cada hembra fue asignada aleatoriamente a un tratamiento experimental (semen fresco, semen congelado con dextrano o semen congelado con ficoll). En el momento de la inseminación, se inducía la ovulación mediante la aplicación intramuscular de 1 microgramo de acetato de buserelina (Suprefact; Sanofi-Aventis S.A., Barcelona, España). Por último, la deposición del semen se realizó con una cánula de inseminación estándar de 24 cm de longitud. En todas las sesiones de inseminación se utilizó un grupo control con una mezcla heteroespérmica de semen de los mismos machos y los dos grupos de semen congelado (dextrano y ficoll).

### 3.9 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 23.0. Se consideraron significativas las diferencias en aquellos casos en los que el p-value era menor que 0,05.

En cuanto a la evaluación del semen fresco de partida, se realizó un análisis descriptivo con los valores de concentración, normalidad, gota citoplasmática, normalidad acrosómica, HOST, motilidad total y progresiva, viabilidad y viabilidad con acrosoma intacto.

Para llevar a cabo la caracterización de las muestras congeladas se realizó un análisis de varianza mediante un modelo lineal general univariado (GLM) para cada característica a evaluar, estableciendo como factores fijos la sesión de congelación y el medio (dextrano o ficoll).

La tasa de fertilidad al parto se analizó mediante un probit binario (modelo lineal generalizado), mientras que la prolificidad se analizó mediante un modelo lineal general univariado (GLM) manteniendo como factores fijos la sesión de congelación y el medio, utilizando semen no congelado como control (dextrano, ficoll y fresco).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Características de las muestras seminales frescas

Previo a la congelación de muestras seminales, se analizaron los parámetros de calidad de cada mezcla heteroespérmica utilizada, de manera que se obtuvieron los datos de concentración en millones de espermatozoides/ml, porcentaje de normalidad, gota, acrosomas no reaccionados (NAR), HOST, motilidad total y progresiva, viabilidad y de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI). Los resultados de las 8 mezclas heteroespérmicas de semen fresco se muestran en la Tabla. 1.

**Tabla. 1** Media de las características de las muestras seminales frescas junto a su error estándar.

	Media	± Error estándar
Concentración (millones de espermatozoides/ml)	627	± 56,7
Normalidad (%)	82	± 2,1
Gota (%)	11	± 1,5
NAR (%)	95	± 0,7
HOST (%)	79	± 1,6
Motilidad total (%)	81	± 3,6
Motilidad progresiva (%)	48	± 6,1
Viabilidad (%)	80	± 1,7
VAI (%)	79	± 1,7

NAR: normalidad acrosómica; HOST: funcionalidad de membrana; VAI: espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

Tal y como se observa en la Tabla. 1, las características seminales de las muestras utilizadas en el presente trabajo indican que se trataba de semen de calidad. La concentración inicial fue de alrededor de 627 millones de espermatozoides/ml, presentando un porcentaje del 82% de normalidad, un 95% de acrosomas no reaccionados (NAR), un 80% de viabilidad espermática y el 79% de los espermatozoides vivos presentaban el acrosoma intacto (VAI). Otro parámetro importante es la motilidad, ya que tanto la total como la progresiva alcanzaron valores del 81% y 48% respectivamente. Todo ello indica claramente que las muestras utilizadas tenían una buena calidad inicial. En el caso de la presencia de gota citoplasmática, al tratarse de una característica indicativa de inmadurez, es recomendable que su porcentaje se mantenga bajo, tal y como ocurre con las muestras utilizadas. Finalmente, un 79% de HOST indica que la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides era elevada.

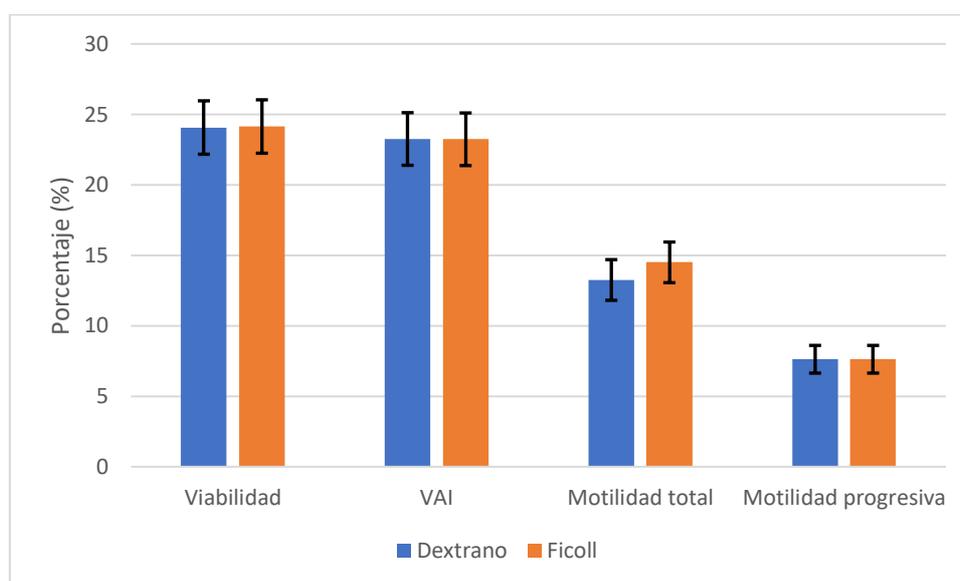
Los valores de los parámetros seminales observados son similares a los obtenidos por otros autores tras la evaluación de la calidad del semen fresco. Así, la concentración en estudios previos va desde los 240 hasta los 380 millones de espermatozoides/ml (Mocé et al., 2010; Viudes-de-Castro et al., 2021), mientras que tanto el porcentaje de normalidad (Lavara et al., 2005; Mocé et al., 2010) como el de acrosomas normales se sitúan sobre el 88-90% (Mocé et al., 2010; Viudes-de-Castro et al., 2021; Viudes-de-Castro & Vicente, 1996). La viabilidad de las muestras generalmente es del 77-83% (Iaffaldano et al., 2012; Maya-Soriano et al., 2015; Viudes-de-Castro et al., 2021), y la motilidad total y progresiva es del 76-80% y 30-60% respectivamente (Ambriz et al., 2002; Mocé et al., 2010; Maya-Soriano et al., 2015; Viudes-de-Castro et al., 2021; Viudes-de-Castro & Vicente, 1996). En cuanto a la gota citoplasmática, el trabajo de Lavara et al. (2005) ofrece un valor del  $8,4 \pm 7,4\%$  para esta característica, y, respecto a la funcionalidad de membrana, el trabajo de Iaffaldano et al. (2012) presenta un HOST aproximado del 76%.

## 4.2 Características de las muestras congeladas con Dextrano y Ficoll

### 4.2.1 Características seminales de viabilidad, daños en el acrosoma y motilidad post-congelación

De cada una de las 8 mezclas heteroespérmicas congeladas, se utilizaron dos pajuelas para llevar a cabo la valoración de la calidad seminal post-congelación con los dos diluyentes experimentales. Se evaluó el porcentaje de viabilidad, el estado del acrosoma de los espermatozoides vivos (VAI), la motilidad total y la progresiva.

En la Figura. 11 se muestran los resultados post-congelación de los parámetros de calidad seminal. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad, estado del acrosoma o motilidad entre ambos medios de congelación.



**Figura. 11** Porcentajes medios de viabilidad, de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI), motilidad total y progresiva obtenidos tras el proceso de congelación con cada diluyente de congelación.

La viabilidad media obtenida fue del 24%. El trabajo de Viudes-de-Castro et al. (2021) obtuvieron viabilidades similares entre el 19,4 y el 32,9 %, utilizando diferentes medios de congelación con dextrano de diferente peso molecular al ensayado en el presente trabajo (60-90 KD). Mientras que, Kulíková et al. (2017), utilizando un medio de congelación de semen con ficoll, obtuvieron mejores resultados entre el 58 y el 66% de viabilidad, dependiendo de la raza de conejo de la que provenía la muestra seminal.

El estado del acrosoma constituye otra característica de interés a la hora de comparar el efecto protector de la adición de ambas macromoléculas. Como se muestra en la Figura. 11, el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (VAI) no presentó diferencias significativas entre ambos diluyentes de congelación, siendo la media de un 23 %, por lo que ambas macromoléculas contribuyeron de la misma forma en la protección de las membranas durante los procesos de congelación y descongelación. En el caso del trabajo de Viudes-de-Castro et al. (2021) previamente comentado, la integridad acrosomal al usar dextrano se sitúa sobre entre el 60 y el 80%, dependiendo del medio utilizado. Sin embargo, Kulíková et al., (2015) utilizando ficoll durante la criopreservación de semen obtienen valores del 38%. Por lo que parece que, si bien el ficoll es capaz de mantener una mayor proporción de espermatozoides

vivos tras la congelación-descongelación, el dextrano parece que ejerce una mejor protección. Sin embargo, es necesario puntualizar que existen diferentes factores que pueden generar variabilidad en los resultados, ya sea la combinación de crioprotectores usados, su concentración, la velocidad de congelación, el tipo de pajuelas, etc. Así, se observan diferencias entre distintas razas de conejo o entre distintos machos de la misma raza debido a su mayor o menor capacidad de soportar todos los cambios físicos y químicos del proceso de criopreservación (Kulíková et al., 2017). La comparación entre artículos resulta compleja debido a la ausencia de un protocolo estandarizado en la congelación de semen de conejo, ya que la mayoría de los artículos pretenden mejorarlo y por ende presentan variaciones. Además, no hay ningún trabajo en el que se evalué la capacidad crioprotectora sobre el semen de ambas macromoléculas bajo las mismas circunstancias. Sin embargo, Dumoulin et al. (1994), trabajando con óvulos de ratón y humano, destacan el efecto protector de ambos polímeros sobre la zona pelúcida, y no encuentran diferencias significativas entre el uso de una u otra molécula. Lo que coincidiría con los resultados obtenidos en el presente trabajo en el caso del semen de conejo. Por lo que, bajo las mismas condiciones, no parece que la distinta conformación espacial de estas macromoléculas de igual peso molecular tenga un gran efecto sobre capacidad crioprotectora de las mismas.

La motilidad espermática es una característica que suele estar muy relacionada con la eficacia reproductiva en el semen fresco, por lo que su determinación en las muestras tratadas con los distintos medios de congelación podría ser un buen indicador de su capacidad crioprotectora (Nishijima et al., 2015). En el presente trabajo, la motilidad de las muestras se evaluó mediante el sistema CASA. No se observaron diferencias significativas en los resultados de motilidad entre ambos grupos. La motilidad total fue del  $13,3 \pm 1,44 \%$  y del  $14,5 \pm 1,44 \%$ . Para el medio con dextrano y ficoll respectivamente. Siendo la motilidad progresiva del  $7,6 \pm 0,98\%$  en ambos casos. Los resultados de motilidad total están en el rango de los observados por Viudes-de-Castro et al. (2021), donde la motilidad se situó entre el 3,2 y el 12,2 % con los distintos diluyentes con dextrano. Al comparar con el trabajo de Kulíková et al. (2015), donde se hace uso del ficoll como crioprotector no permeable en semen de conejo, la motilidad total observada llega hasta el 50%. Las diferencias percibidas en cuanto a motilidad total entre ambos artículos pueden radicar en la metodología de análisis de la motilidad, principalmente en la dilución que se aplica en cada caso, ya que Viudes-de-Castro et al., (2021) ajusta la concentración a 7,5 millones de espermatozoides/ml para el análisis en una cámara Makler, mientras que Kulíková et al., (2015) la ajusta a 125 millones de espermatozoides/ml y hace uso de una cámara Leja.

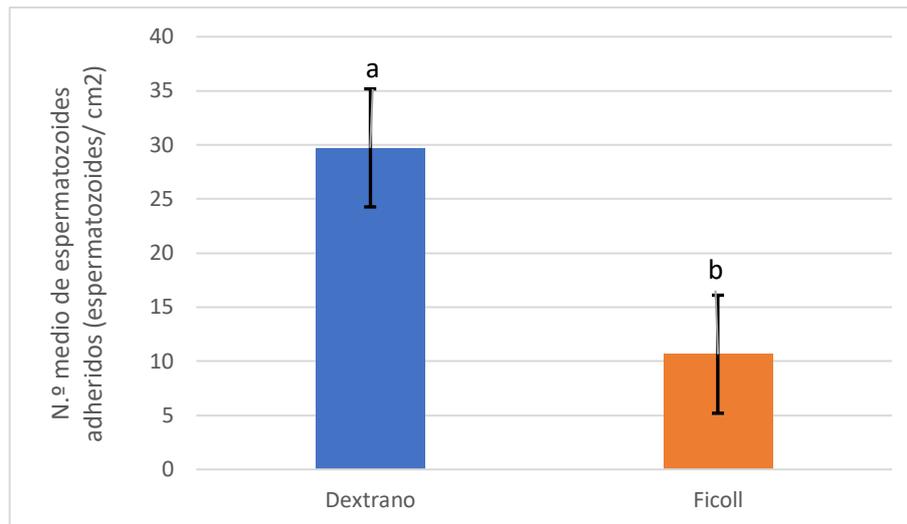
Por lo que, respecto a los resultados de motilidad obtenidos en el presente trabajo, debe tenerse en cuenta la elevada tasa de dilución que se realizó para llevar las muestras desde la concentración de la que partimos hasta la concentración de 15 millones de espermatozoides/ml, que es la que se utilizó en el programa CASA. La tasa de dilución afecta mucho al semen congelado (Viudes-de-Castro et al., 2021), ya que los procesos de congelación y descongelación a los que se ha sometido a la muestra hacen que su membrana plasmática se encuentre en un estado mucho más sensible que el semen fresco, por lo que responderá de forma diferente al proceso de dilución. Sería recomendable establecer un nuevo protocolo de dilución de las muestras de semen congelado para evaluar la motilidad. Es posible que realizar diluciones seriadas espaciadas en el tiempo de manera previa al análisis pueda contribuir a mejorar las valoraciones de motilidad de las muestras de semen congelado, ya que éstas no soportan igual que las frescas el estrés que supone realizar grandes diluciones, lo que podría explicar los bajos resultados de motilidades observados, ya que lo que no se correspondería con los resultados de fertilidad observados *in vivo*.

#### 4.2.2 Test biológico

La realización de esta prueba biológica pretende evaluar el nivel de capacitación de los espermatozoides criopreservados al usar tanto una macromolécula como la otra. Tras realizar el co-cultivo con las células oviductales de conejo se cuantificó el número de espermatozoides/cm<sup>2</sup> adheridos sobre la placa tras el último lavado. Se observaron diferencias significativas entre diluyentes. Así, en aquellas placas en las que se había colocado el semen criopreservado con dextrano, el número medio fue de  $29,7 \pm 5,45$  espermatozoides/cm<sup>2</sup>, mientras que en aquellas en las que el semen utilizado fue el criopreservado con ficoll fue de  $10,7 \pm 5,45$  espermatozoides/cm<sup>2</sup> (Figura 12).

El epitelio oviductal tiene un rol esencial en los procesos de transporte de gametos, capacitación espermática y fecundación, cabe reseñar que la adhesión de las células tanto ciliares como secretoras del epitelio oviductal a los espermatozoides permite regular la actividad espermática reduciendo los niveles de calcio libre intracelular en el esperma durante el proceso de capacitación espermática (Dobrinski et al., 1997 y 1999). En los experimentos llevados a cabo por Dobrinski se demostró que el mantenimiento de niveles bajos de Ca<sup>2+</sup> se consigue mediante la interacción de un receptor espermático con su respectivo ligando en el epitelio oviductal. Además, en este estudio también se observó como los exosomas (vesículas) producidos por las células epiteliales del istmo permitían mantener bajos los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular en los espermatozoides y postergaban el proceso de capacitación y apoptosis de éstos. La interpretación del test biológico que se ha diseñado dependerá de si el cultivo de células oviductales *in vitro* conservó funciones homólogas a las de epitelio oviductal *in vivo*. Si hubiera sido así, aquellos espermatozoides que se unen al epitelio son los que muestran un estado de sus membranas equivalente al de los espermatozoides que llegan al oviducto en condiciones naturales y que por ende están en un estadio de capacitación temprana que puede ser regulado, por lo que los espermatozoides congelados con dextrano conservarían una funcionalidad similar a los de un eyaculado. Por el contrario, si las células oviductales cultivadas no han conservado su funcionalidad, cabe indicar que los espermatozoides congelados suelen adherirse entre ellos y a las superficies como consecuencia de los daños que sufren en sus membranas, en este caso el ficoll podría estar proporcionando mejores resultados. Desgraciadamente la diferencia de adhesión observada no puede ser interpretada en el presente estudio ya que no se han observado diferencias ni en los parámetros *in vitro* evaluados ni en su fertilidad y prolificidad. En posteriores estudios será necesario ampliar el número de muestras evaluadas e incluir semen no congelado para interpretar y validar este nuevo test biológico.

En conclusión, se observó una adherencia diferencial a las células oviductales entre los espermatozoides congelados con dextrano o ficoll, lo que podría indicar que las membranas de los espermatozoides de uno u otro tratamiento resultan modificadas o alteradas, dificultando la adhesión de aquellos que fueron congelados con ficoll.



**Figura. 12** Número medio de espermatozoides/cm<sup>2</sup> adheridos al cultivo de células epiteliales de oviducto de conejo obtenido para cada macromolécula. Las columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas (p-value<0,05).

#### 4.3 Análisis de la capacidad fecundante *in vivo*

Con la mitad de las sesiones congeladas se llevaron a cabo inseminaciones artificiales para evaluar la capacidad fecundante *in vivo*. En la Tabla. 2 se muestran los resultados de fertilidad y prolificidad al parto obtenidos en los diferentes grupos experimentales.

**Tabla. 2** Tasa media de fertilidad al parto y número medio de nacidos totales y vivos de los diferentes grupos experimentales. Los datos se presentan como la media por mínimos cuadrados junto con su error estándar (LSM±SE).

	N.º conejas inseminadas	Tasa media de fertilidad al parto (tanto por uno)	N.º medio de nacidos totales	N.º medio de nacidos vivos
Dextrano	59	0,67 ± 0,062	10,0 ± 0,52	8,93 ± 0,61
Ficoll	58	0,65 ± 0,063	9,3 ± 0,53	8,45 ± 0,63
Fresco	48	0,83 ± 0,056	10,4 ± 0,52	9,25 ± 0,62

Para poder estudiar las posibles diferencias entre el semen congelado y el fresco, se analizaron los datos conjuntos de los grupos de congelado (dextrano y ficoll) frente a los del semen fresco, mostrándose los resultados en la Tabla. 3.

**Tabla. 3** Tasa de fertilidad al parto y número de nacidos totales y vivos obtenido para el semen criopreservado y el semen fresco. Los datos se presentan como la media por mínimos cuadrados junto con su error estándar (LSM±SE).

	N.º conejas inseminadas	Tasa media de fertilidad al parto (tanto por uno)	N.º medio de nacidos totales	N.º medio de nacidos vivos
Congelado	117	0,66 ± 0,044 <sup>a</sup>	9,6 ± 0,37	8,7 ± 0,44
Fresco	48	0,83 ± 0,056 <sup>b</sup>	10,4 ± 0,52	9,3 ± 0,62

Valores en una columna con diferente superíndice difieren significativamente con una P<0,05.

#### 4.3.1 Tasa de fertilidad al parto

La tasa de fertilidad al parto se define como el número de hembras paridas del total de hembras inseminadas. La tasa media de fertilidad al parto para el semen congelado con los diluyentes experimentales que contenían dextrano y ficoll fue de  $0,67 \pm 0,062$  y  $0,65 \pm 0,063$  (Tabla 2), respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ellos. Por su parte, en el grupo de hembras inseminadas con semen fresco la tasa de fertilidad fue de  $0,83 \pm 0,056$ . A pesar de estos resultados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tipo de muestra seminal utilizada (p-value = 0,063).

El hecho de que no existan diferencias significativas entre los grupos probablemente se deba al tamaño muestral, dado que el valor del p-value está muy próximo a 0,05. Por lo que es posible que con las siguientes sesiones de inseminación que se van a llevar a cabo, las diferencias se hagan evidentes. De ahí que, para corroborar esto, se analizaran conjuntamente los datos obtenidos para el semen congelado frente a los del semen fresco (Tabla. 3). En este caso, sí aparecen diferencias estadísticamente significativas en la fertilidad obtenida, siendo de  $0,66 \pm 0,044$  y  $0,83 \pm 0,056$  para el semen congelado y el fresco respectivamente, con un p-value de 0,019.

Los datos de fertilidad obtenidos en el presente trabajo son inferiores a los observados por Viudes-de-Castro et al. (2021) y Kuliková et al. (2015), siendo estos del 0,84 usando dextrano y 0,74 usando ficoll respectivamente. En ambos estudios no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la inseminación con semen criopreservado y fresco (0,84 vs 0,88 en el primero y 0,74 vs 0,79 en el segundo). Sin embargo, en otros artículos como el de Viudes-De-Castro et al., (2005) donde se evalúa la capacidad fecundante *in vivo* del semen de conejo criopreservado con un medio de congelación base similar al del presente trabajo, pero sin la adición de ninguna de las macromoléculas del presente estudio, sí se detectan diferencias significativas entre el semen fresco (tasa de 0,70) y el congelado (tasa de 0,64) al trabajar con un tamaño muestral superior tanto al de los artículos previamente mencionados como al del presente trabajo. Lo cual refuerza la suposición de que la falta de diferencias significativas entre la fertilidad obtenida con semen fresco y congelado que se muestran en la Tabla. 2 se debe al escaso número de hembras inseminadas. Tal y como se demuestra en los análisis conjuntos de los grupos de congelado frente al semen fresco (Tabla. 3).

#### 4.3.2 Prolificidad

La evaluación de la prolificidad obtenida con los tres tipos de muestras seminales se llevó a cabo mediante el recuento del número de nacidos totales y vivos en el momento del parto de las conejas.

El número medio de nacidos totales fue muy similar entre grupos, siendo de  $10,0 \pm 0,52$ ,  $9,3 \pm 0,53$  y  $10,4 \pm 0,52$  para los grupos de dextrano, ficoll y fresco, respectivamente (Tabla 2). No observándose diferencias significativas entre ellos. El p-value obtenido fue de 0,352, muy alejado del valor de significación, por lo que al analizar los datos agrupados de congelado frente a fresco (Tabla 3) tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (p-value de 0,272). Siendo el número medio de nacidos totales de  $9,6 \pm 0,37$  en el caso del semen congelado y de  $10,4 \pm 0,52$  gazapos para el semen fresco.

La evaluación del número de nacidos vivos de las hembras inseminadas para cada tratamiento permite detectar si existen diferencias en la mortalidad perinatal entre tratamientos. La Tabla. 2 presenta los resultados obtenidos para cada tratamiento, siendo el número medio de nacidos

vivos de  $8,93 \pm 0,61$ ,  $8,45 \pm 0,63$  y  $9,25 \pm 0,62$  para los grupos de dextrano, ficoll y fresco, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ellos (p-value de 0,659).

Cuando se analizaron los datos agrupando los pertenecientes al semen criopreservado frente a los del fresco (Tabla. 3) se observa que el semen criopreservado y el fresco ofrecen cifras similares en cuanto a número de nacidos vivos (p-value = 0,464).

Por lo que, bajo las condiciones y metodología descritas en el trabajo, aquella hembra que queda preñada con el semen criopreservado con cualquiera de los diluyentes de congelación pare de media el mismo número de gazapos totales y vivos que las hembras inseminadas con el semen fresco.

En el presente trabajo no se han observado diferencias de prolificidad entre el semen congelado y el fresco, lo que coincide con lo observado tanto por Viudes-de-Castro et al. (2021) como por Kuliková et al. (2015). Sin embargo, en ambos trabajos el número de nacidos totales es algo inferior a lo obtenido en el presente trabajo, siendo este de  $8,3 \pm 0,5$  al trabajar con dextrano en el primero y de  $8,05 \pm 2,85$  al trabajar con ficoll en el segundo. El número de nacidos vivos también aparece invariable en los trabajos de Kuliková et al. (2015) y Rosato & Iaffaldano, (2013), siendo de  $7,32 \pm 2,87$  al trabajar con ficoll y de  $7,6 \pm 2,8$  al trabajar con BSA y trehalosa. Otros autores como Viudes-De-Castro et al. (2005) sí obtuvieron tamaños de camada inferiores con el semen congelado al comparar con la inseminación con fresco, siendo de  $5,3 \pm 0,34$  frente a  $8,8 \pm 0,26$ . En este caso el medio de congelación, a pesar de utilizar los mismos crioprotectores que el presente trabajo, no llevaba ninguna de las macromoléculas de estudio, lo que podría ser uno de los factores que marque la diferencia entre la obtención de un semen criopreservado que *in vivo* es capaz de estar al mismo nivel que el fresco.

## 5. CONCLUSIONES

No se han detectado diferencias significativas ni en la motilidad, viabilidad y daños en acrosoma entre los medios de congelación que contienen dextrano y ficoll. A pesar de esto, las muestras congeladas con ficoll tuvieron una menor capacidad para adherirse a las células oviductales en el ensayo *in vitro* realizado, lo que indicaría cambios diferenciales en las membranas entre los espermatozoides congelados con dextrano y ficoll no detectables con las otras pruebas *in vitro*. Los resultados de las inseminaciones realizadas con el semen congelado con dextrano y ficoll no permiten alcanzar los índices de fertilidad al parto de la inseminación con semen no congelado (fresco). Por lo que ambos medios tan solo permiten abordar objetivos de conservación y difusión, pero todavía no son competitivos para su aplicación en cunicultura.

Al no existir diferencias en los resultados de calidad seminal y capacidad fecundante *in vivo*, se podrá utilizar una u otra macromolécula indistintamente en el medio de congelación de semen.

Por último, remarcar que es necesario diseñar un test *in vitro* que nos permita determinar la capacidad fecundante del semen congelado sin necesidad de recurrir a ensayos de inseminación artificial, que consumen muchos más recursos económicos y de tiempo. La aproximación llevada a cabo en el presente trabajo parece indicar diferencias en la capacidad para adherirse e interactuar con las células oviductales entre ambos, sin embargo, estas diferencias no son suficientes para determinar una pérdida de la capacidad fecundante *in vivo*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M., Ahmad, N., Riaz, A., & Anzar, M. (2015). Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. *Reproduction, Fertility, and Development*, 27(5), 784–793. <https://doi.org/10.1071/RD13400>
- Awan, M., Buriak, I., Fleck, R., Fuller, B., Goltsev, A., Kerby, J., Lowdell, M., Mericka, P., Petrenko, A., Petrenko, Y., Rogulska, O., Stolzing, A., & Stacey, G. N. (2020). Dimethyl sulfoxide: A central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative Medicine*, 15(3), 1463–1491. <https://doi.org/10.2217/RME-2019-0145/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE1.JPEG>
- Axnér, E. (2006). Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66(1), 14–24. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.03.022>
- Baqer Minaei, M., Barbarestani, M., Nekoonam, S., Abbas Abdolvahabi, M., Takzare, N., Hossein Asadi, M., Hedayatpour, A., & Amidi, F. (2012). Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. In *Iran J Reprod Med* (Vol. 10, Issue 2).
- Cheuquemán, C., Faúndez, R., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2018). Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*, 50(9), e13080. <https://doi.org/10.1111/AND.13080>
- Chian, R. C. (2010). Cryobiology: An overview. In *Fertility Cryopreservation* (pp. 1–9). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511730207.002>
- Curry, M. R. (2007). Cryopreservation of mammalian semen. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 368, 303–311. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_21)
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2(1), 48–54. <https://doi.org/10.1530/ROR.0.0020048>
- di Iorio, M., Colonna, M. A., Miranda, M., Principe, P., Schiavitto, M., Cerolini, S., Manchisi, A., & Iaffaldano, N. (2018). Initial cooling time before freezing affects post-thaw quality and reproductive performance of rabbit semen. *Animal Science Journal*, 89(9), 1240–1244. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13046>
- Ezzati, M., Shanebandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiasl, M. (2020). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S10561-019-09797-0/FIGURES/3>
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Santos, A. N., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(1), 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>
- Foote, R. H., & Carney, E. W. (2000). *The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies*. [www.elsevier.com/locate/reprotox](http://www.elsevier.com/locate/reprotox)

- Gilmore, J. A., Liu, J., Peter, A. T., & Critser, J. K. (1998). Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, *58*(1), 28–36. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD58.1.28>
- Iaffaldano, N., di Iorio, M., & Rosato, M. P. (2012). The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology*, *78*(6), 1381–1389. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.06.009>
- Kamaruzaman, N. A., Kardia, E., Kamaldin, N. A., Latahir, A. Z., & Yahaya, B. H. (2013). The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/691830>
- Kubovicova, E., Makarevich, A. v., Balazi, A., Vasicek, J., & Chrenek, P. (2021). Factors affecting rabbit sperm cryopreservation: A mini-review. In *Zygote*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000137>
- Kuliková, B., di Iorio, M., Kubovicova, E., Kuzelova, L., Iaffaldano, N., & Chrenek, P. (2015). The cryoprotective effect of Ficoll on the rabbit spermatozoa quality. *Zygote*, *23*(5), 785–794. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000471>
- Kulíková, B., Oravcová, M., Baláži, A., Supuka, P., & Chrenek, P. (2017). Factors affecting storage of Slovak native rabbit semen in the gene bank. *Zygote (Cambridge, England)*, *25*(5), 592–600. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000454>
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Viudes De Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, *64*(5), 1130–1141. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.01.009>
- Liu, X., Lei, W., Wu, Z., Cui, Y., Han, B., Fu, S., & Jiang, C. (2012). Effects of glucocorticoid on BMD, micro-architecture and biomechanics of cancellous and cortical bone mass in OVX rabbits. *Medical Engineering and Physics*, *34*(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2011.06.010>
- Lucas, C. C., Melo, L. R., de Sousa, M. L. N. M., de Moraes, G. B., Martins, M. F., Xavier, F. A. F., Evangelista, J. S. A. M., & de Souza Sampaio, C. M. (2018). Cryoprotectant agents and cooling effect on embryos of *Macrobrachium amazonicum*. *Zygote (Cambridge, England)*, *26*(2), 111–118. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000661>
- Maeda, T., Liu, E., Nishijima, K., Tanaka, M., Yamaguchi, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., & Kitajima, S. (2012). Effect of the primary cooling rate on the motility and fertility of frozen-thawed rabbit spermatozoa. *World Rabbit Science*, *20*(2), 65–70. <https://doi.org/10.4995/WRS.2012.1080>
- Matsuhisa, F., Kitajima, S., Nishijima, K., Akiyoshi, T., Morimoto, M., & Fan, J. (2020). Transgenic rabbit models: Now and the future. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 10, Issue 21, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app10217416>
- Maya-Soriano, M. J., Taberner, E., Sabés-Alsina, M., Piles, M., & Lopez-Bejar, M. (2015). Absence of beneficial effects on rabbit sperm cell cryopreservation by several antioxidant agents. *Zygote (Cambridge, England)*, *23*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000270>

- Moce, E., Blanch, E., Talavan, A., & Viudes De Castro, M. P. (2015). Effect of different freezing velocities on the quality and fertilising ability of cryopreserved rabbit spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(5), 846–851. <https://doi.org/10.1071/RD14009>
- Mocé, E., Lavara, R., & Vicente, J. S. (2010). Effect of Cooling Rate to 5°C, Straw Size and Farm on Fertilizing Ability of Cryopreserved Rabbit Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), e1–e7. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2009.01507.X>
- Mocé, E., & Vicente, J. S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 110, Issues 1–2, pp. 1–24). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.015>
- Mocé, E., Vicente, J. S., & Lavara, R. (2003). Effect of freezing–thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60(1), 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01329-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01329-8)
- Mocé, E., Vicente, J. S., Mocé, E., & Vicente, J. S. (2002). Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. *Reproduction Nutrition Development*, 42(3), 189–196. <https://doi.org/10.1051/RND:2002017>
- Nishijima, K., Kitajima, S., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., & Matsuda, Y. (2015). Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*, 84(7), 1172–1175. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.06.018>
- Nishijima, K., Kitajima, S., Matsuhisa, F., Niimi, M., Wang, C. C., & Fan, J. (2021). Strategies for highly efficient rabbit sperm cryopreservation. In *Animals* (Vol. 11, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11051220>
- Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 878–892. <https://doi.org/10.1002/MRD.20686>
- Rosato, M. P., & Iaffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508–516. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.11.008>
- Shehata, F., & Chian, R. C. (2010). Cryopreservation of sperm: An overview. In *Fertility Cryopreservation* (pp. 39–45). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511730207.006>
- Sudagar, M., Keivanloo, S., & Hajibeglou, A. (2018). Effect of different permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Aquaculture International*, 26(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/S10499-017-0192-4/TABLES/3>
- Thomas, B., Bhat, K., & Mapara, M. (2012). Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal*, 9(1), 111. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.92960>

- Vicente, J. S., & Viudes-de-Castro, M. P. (1996). A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reproduction, Nutrition, Development*, 36(5), 485–492. <https://doi.org/10.1051/RND:19960504>
- Viudes-de-Castro, M. P., Lavara, R., Safaa, H. M., Marco-Jiménez, F., Mehaisen, G. M. K., & Vicente, J. S. (2014). Effect of freezing extender composition and male line on semen traits and reproductive performance in rabbits. *Animal*, 8(5), 765–770. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000135>
- Viudes-De-Castro, M. P., Mocé, E., Vicente, J. S., Marco-Jiménez, F., & Lavara, R. (2005). In vitro evaluation of in vivo fertilizing ability of frozen rabbit semen. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 40(2), 136–140. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2005.00568.X>
- Viudes-de-Castro, M. P., Talaván, A. G., & Vicente, J. S. (2021). Evaluation of dextran for rabbit sperm cryopreservation: Effect on frozen-thawed rabbit sperm quality variables and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 226. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106714>
- Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (1996). A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Animal Reproduction Science*, 44(3), 195–201. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01550-3](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01550-3)
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Zhu, Z., Fan, X., Lv, Y., Zhang, N., Fan, C., Zhang, P., & Zeng, W. (2015). Vitamin E Analogue Improves Rabbit Sperm Quality during the Process of Cryopreservation through Its Antioxidative Action. *PLOS ONE*, 10(12), e0145383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145383>