

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



Efecto de los polisacáridos ficoll y dextrano en el medio
de congelación sobre la viabilidad y fecundidad del semen
de conejo

Grado en Biotecnología

Curso académico: 2015-2016

Autor: Pedro Marín Puchades

Tutor: José Salvador Vicente Antón

Cotutora: María Pilar Viudes de Castro

Valencia, julio de 2016



Datos personales.

Nombre y apellidos: Pedro Marín Puchades

Datos del trabajo de fin de grado.

Título: Efecto de los polisacáridos ficoll y dextrano en el medio de congelación sobre la viabilidad y fecundidad del semen de conejo.

Tutor/a Académico: D. José Salvador Vicente Antón

Cotutor/a: Dña. María Pilar Viudes de Castro

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2016

Tipo de licencia: Creative Commons: *Atribución-NoComercial-NoDerivadas* (CC BY-NC-ND)

Resumen.

Los medios utilizados para congelar semen de conejo incluyen como crioprotectores la acetamida, el dimetilsulfóxido y en muchos casos yema de huevo o un disacárido (sacarosa o trealosa). A día de hoy, la posibilidad de inseminar con semen congelado con fines productivos es todavía descartable a consecuencia de sus inferiores y variables tasas de fertilidad y prolificidad. En los últimos años se ha estudiado la incorporación al medio de criopreservación de polisacáridos como el dextrano o el ficoll. Estos compuestos son capaces de reducir tanto los daños por la formación de cristales intra y extracelulares como el estrés osmótico derivados de los medios de criopreservación. Por ello, el objetivo del presente estudio es evaluar la utilización del ficoll y dextrano en un medio de criopreservación espermática de conejo y comprobar cómo afectan tanto a la preservación de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) como a la motilidad y fecundidad de los espermatozoides.

El trabajo se realizó en 2 fases experimentales. En la primera se evaluaron 8 medios de criopreservación espermática que diferían en sus niveles de concentración inicial de ficoll y dextrano (4 y 6% peso/volumen) y concentración de sacarosa (0.1M y 0.05M) frente a un medio estándar de criopreservación sin polisacáridos y con 0.1 M de sacarosa. Para cada uno de ellos (9) se valoraron el porcentaje de espermatozoides post-descongelación que no sufrieron daños a nivel de membrana plasmática y acrosomal y los parámetros cinéticos de los espermatozoides. En la segunda fase, atendiendo a los resultados obtenidos *in vitro* y a las limitaciones del estudio *in vivo*, se seleccionaron dos de los medios y dos protocolos de criopreservación que diferían en la velocidad de congelación, y se evaluó la fecundidad y prolificidad de éstos frente a un grupo control (semen no congelado).

Los análisis post-descongelación mostraron que la adición de los polisacáridos al medio no contribuyó a mejorar ninguno de los parámetros espermáticos evaluados. En cambio, sí que se observó un efecto de la concentración de sacarosa en el medio, siendo inferiores los daños post-descongelación a nivel de membrana plasmática y acrosomal cuando la concentración de sacarosa en el medio era de 0,1 M.

En cuanto a la segunda fase experimental, los resultados de los análisis *in vivo* para los medios seleccionados (medio de criopreservación estándar y medio con dextrano al 6% peso/volumen y sacarosa 0,1M) mostraron una respuesta diferencial de los medios en función del protocolo de criopreservación utilizado, obteniendo porcentajes de fertilidad al parto similares al control para el medio estándar con el protocolo de congelación programable y prolificidades similares al control para el medio estándar con el protocolo de congelación en caja. No obstante, teniendo en cuenta ambos parámetros productivos el semen descongelado no permitió obtener resultados competitivos con el control. Así pues, en base a los resultados obtenidos, puede concluirse que la adición de un polímero de ficoll o dextrano (pm 70.000) a niveles del 4 y 6 % (peso/volumen) a un medio estándar no mejora los parámetros de calidad seminal *in vitro* ni los productivos *in vivo*.

Palabras clave.

Criopreservación, esperma, conejo, ficoll, dextrano, fecundidad.

Title.

Effect of ficoll and dextran polysaccharides in the freezing medium on the viability and fertility of rabbit sperm

Abstract.

The mediums used to freeze rabbit sperm include acetamide, dimethylsulfoxide and, in many cases, egg yolk or a disaccharide (sucrose or trehalose) as cryoprotectants. Nowadays, the possibility of inseminate with frozen semen for productive purposes is still ruled out because their lower and variable rates of fertility and prolificacy. In recent years, have been studied the incorporation of polysaccharide, such as dextran or ficoll, to the cryopreservation medium. These compounds are able to reduce damage due to the formation of intra and extracellular crystals as osmotic stress derivatives of cryopreservation medium. Therefore, the objective of this study is to evaluate the application of ficoll and dextran in the medium of rabbit sperm cryopreservation and check how they affect to the preservation of sperm membranes (plasmatic and acrosome), motility and fertility.

The study was conducted in two experimental phases. In the first, 8 mediums of sperm cryopreservation were performed. These mediums differed in their initial ficoll and dextran concentration levels (4 and 6% weight / volume) and sucrose concentration (0.05M 0.1M and) and were evaluated against a standard cryopreservation medium without polysaccharide and 0.1 M sucrose. For each (9) were evaluated the percentage of sperm post-thaw with not damage at plasma and acrosomal membrane level and kinetic parameters of sperm. In the second phase, based on the results obtained *in vitro* and limitations of the study *in vivo*, two mediums and two freezing protocols, which differed in the rate of freezing, were tested, analysing the fertility and prolificacy versus a control group (not frozen sperm).

Post-thaw analysis do not show significance of the polysaccharide in the medium for any of the parameters evaluated. However, an effect of sucrose concentration was observed in the medium, being lower post-thaw damage at plasmatic and acrosomal membrane level, when the sucrose concentration in the medium was 0.1 M. In the second experimental phase, the results of *in vivo* analysis of the selected mediums (standard cryopreservation medium and a medium with dextran at 6% weight / volume and 0.1M sucrose) showed a differential response of the medium according to the cryopreservation protocol used. Similar fertility rates to the fresh control for standard medium with the programmable freezing protocol were obtained and similar prolificity to the fresh control for standard medium with the freezing box protocol. However, taking into account both production parameters, the post-thawed sperm not allowed to obtain competitive results with the fresh control. Thus, based on the results obtained, it can be concluded that the addition of ficoll or dextran polymer (mw 70,000) at levels of 4 and 6 % (weight/volume) to a standard medium does not improve *in vitro* and *in vivo* results.

Key words.

Cryopreservation, sperm, rabbit, ficoll, dextran, fertility.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a José, quien ha dirigido mi trabajo de final de grado, la oportunidad, tiempo, conocimiento y paciencia que me ha brindado para poder realizar este proyecto y así finalizar mis estudios universitarios. Agradecer también a Pilar, quien ha sido mi codirectora de proyecto y que, junto a Paula y Lucía han colaborado en la parte experimental que he realizado en las instalaciones del Centro de Investigación y Tecnología Animal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA).

También quiero agradecer el trato recibido por parte de todo el personal con el que he compartido laboratorio (Paco, Luis, Ximo, Carmen, Marta, Jesús, Jose y Misael) y desearles mucha suerte en su carrera como profesionales y en sus futuros proyectos.

Durante nuestros años de formación, muchos profesores van pasando por nuestras vidas, mostrándonos como es el mundo y dándonos las herramientas necesarias para enfrentarnos a él. Algunos dejan en nosotros más huella que otros, pero al fin y al cabo son ellos los que, en gran parte, han hecho que nos convirtamos en las personas que somos hoy en día y considero que es un mérito que no les agradecemos lo suficiente. Por ello he querido dedicarles estas líneas a todos y cada uno de los profesores que me han impartido docencia hasta ahora, sin ellos no hubiese llegado hasta aquí.

Empecé la carrera junto a un grupo de compañeros que, a lo largo de estos 4 años, se han convertido en grandes amigos y estoy convencido de que llegarán a ser excelentes profesionales. Han hecho que mi paso por la universidad sea una etapa que recordaré siempre con una enorme sonrisa. Muchas gracias limones!

No puedo olvidarme de mis amigos Emilio, Joel, Jose Miguel, Julián, Miguel, Oscar y Ximo. Desde la infancia hemos crecido juntos, aprendido unos de otros, compartido estudios, viajes, retos, objetivos... Juntos hemos logrado tanto como nos hemos propuesto, hemos aprendido a respetarnos, apoyarnos, comprendernos y querernos. Por ello considero que esta amistad me ha enriquecido como persona y espero que nos queden muchos años más por delante para disfrutarla.

Considero que soy una persona muy afortunada, pues he tenido en mi vida todo cuanto he podido necesitar y más. Siempre ha estado a mi lado alguien que me enseñase y cuidase, un hombro en el que apoyarme, que se preocupase por mi salud, mi educación y mi futuro, ejemplos que seguir, alguien que me dijese cuando estaba equivocado y que disfrutase más que yo con cada paso que daba. Tengo una familia que me ha dado todo cuanto soy.

Muchas gracias a todos!

Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Criopreservación.	1
1.1.1. Problemas de la criopreservación del espermatozoides.	1
1.1.2. Ventajas de la criopreservación del espermatozoides.	2
1.2. Características del espermatozoides fértil.	3
1.2.1. Evaluación de la calidad del espermatozoides. Capacidad fecundante.	3
1.2.2. Correlación entre los resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	4
1.3. Criopreservación del espermatozoides de conejo.	5
1.3.1. Historia de la criopreservación del espermatozoides de conejo.	5
1.3.2. Medios y agentes crioprotectores.	5
1.3.3. Protocolos de congelación-descongelación.	7
1.3.4. Problemas con la criopreservación de espermatozoides de conejo.	8
1.3.5. Fertilidad y prolificidad. Factores que influyen en los resultados.	8
2. OBJETIVO.	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	11
3.1. Diseño experimental.	11
3.1.1. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación <i>in vitro</i> sobre los parámetros seminales post-descongelación.	11
3.1.2. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.	11
3.2. Animales experimentales y condiciones ambientales.	11
3.3. Recolección del semen.	12
3.4. Evaluación inicial del semen.	13
3.5. Análisis de los parámetros seminales.	13
3.5.1. Determinación de la concentración.	13
3.5.2. Análisis morfológicos.	14
3.5.3. Análisis de la viabilidad.	15
3.5.4. Análisis de la motilidad.	16
3.6. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación <i>in vitro</i> sobre los parámetros seminales post-descongelación.	17
3.6.1. Medios de congelación ensayados.	17
3.6.2. Protocolo de congelación.	18
3.6.3. Protocolo de descongelación del semen.	19
3.6.4. Evaluación de los parámetros seminales post-descongelación.	19

3.7. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.	19
3.7.1. Medios de congelación ensayados.	19
3.7.2. Protocolo de criopreservación del semen.	19
3.7.3. Citometría de flujo.	20
3.7.3.1. Determinación de la viabilidad mediante citometría de flujo.	20
3.7.3.2. Determinación del estado de los acrosomas mediante citometría de flujo.	21
3.7.4. Inseminación artificial.	22
3.8. Análisis estadístico.	23
4. RESULTADOS.	24
4.1. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación <i>in vitro</i> sobre los parámetros seminales post-descongelación.	24
4.1.1. Mezclas heterospérmicas incluidas en el estudio.	24
4.1.2. Efecto de los medios de criopreservación sobre los parámetros no-cinéticos del esperma post-descongelación.	25
4.1.3. Efecto de los medios de criopreservación sobre los parámetros cinéticos del esperma post-descongelación.	26
4.2. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.	27
4.2.1. Parámetros seminales post-descongelación.	28
4.2.2. Fertilidad al parto y prolificidad.	30
5. DISCUSIÓN.	31
5.1. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación <i>in vitro</i> sobre los parámetros seminales post-descongelación.	31
5.2. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.	32
6. CONCLUSIÓN.	34
7. BIBLIOGRAFÍA.	35

Índice de figuras

Figura 1. Hipotéticas subpoblaciones de espermatozoides consideradas como fértiles en una muestra de semen en función del número de atributos evaluados simultáneamente (Amann y Hammerstedt, 1993).	3
Figura 2. Materiales para armar la vagina artificial.....	12
Figura 3. Vagina artificial armada	12
Figura 4. Evaluación del estado de los acrosomas. En rojo los acrosomas dañados (presentan la membrana difusa), en amarillo los intactos (se observa la membrana nítida). Imagen A tomada a 400x; imágenes B y C tomadas a 1000x.	14
Figura 5. Análisis del estado morfológico de los espermatozoides. En verde se observan los que presentan una morfología anormal; en púrpura los considerados como normales. Las tres imágenes (A, B, C) han sido tomadas a 400x.	15
Figura 6. Imagen A, tomada a 400x con el filtro B-2A, se observan las células viables. Imagen B, tomada a 400x con el filtro G-2A, se observan las células no-viables.....	16
Figura 7. Imágenes de las trayectorias espermáticas analizadas por el sistema CASA. Imagen A, mezcla heterospérmica en fresco. Imagen B, mezcla heterospérmica congelada-descongelada.	17
Figura 8. Caja de congelación con gradilla para el soporte de las pajuelas.	19
Figura 9. Congelador programable automático	20
Figura 10. Datos y gráficos obtenidos en el análisis de la viabilidad espermática mediante citometría de flujo.	21
Figura 11. Datos y gráficos obtenidos en el análisis del estado de los acrosomas mediante citometría de flujo.	22
Figura 12. Porcentaje de acrosomas intactos post-descongelación en función del medio de criopreservación. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar). Columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).	25
Figura 13. Porcentaje de viabilidad post-descongelación en función del medio de criopreservación. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar). Columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).	26
Figura 14. Porcentaje de motilidad post-descongelación en función del medio de criopreservación. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar).	26
Figura 15. Valores de los parámetros cinéticos de los espermatozoides post-descongelación en función del medio de criopreservación (VCL, VAP, LIN y ALH; gráficas A, B, C y D respectivamente). Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar).	27
Figura 16. Porcentaje de espermatozoides viables post-descongelación en función del grupo experimental. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar).	28

Figura 17. Porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto post-descongelación en función del grupo experimental. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar) 29

Figura 18. Porcentaje de motilidad post-descongelación en función del grupo experimental. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm el error estándar) 29

Índice de tablas

Tabla 1. Composición inicial de los medios de congelación estudiados. 18

Tabla 2. Valores de los parámetros (no-cinéticos) de las mezclas heterospérmicas incluidas en el experimento 1. 24

Tabla 3. Valores de los parámetros (cinéticos) de las mezclas heterospérmicas incluidas en el experimento 1. 24

Tabla 4. Datos de las inseminaciones y sus resultados para cada uno de los 5 grupos de trabajo que forman el experimento 2. 30

Abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ALH:** Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (μm)
- BSA:** Albúmina de suero bovino
- CASA:** Análisis seminales asistidos computacionalmente
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- IP:** Yoduro de propidio
- LIN:** Índice de linealidad
- MEC:** Medio estándar de congelación
- PNA:** Lectina de la planta de cacahuete *Arachis hypogaea*
- TCG:** Tris-ácido cítrico-glucosa
- VAP:** Velocidad media ($\mu\text{m/s}$)
- VCL:** Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$)
- Caja:** Protocolo de criopreservación que utiliza una caja de polietileno expandido
- Prog:** Protocolo de criopreservación que utiliza un congelador programable automático
- F70N4:** Medio de criopreservación con ficoll (4% peso/volumen) y sacarosa (0.1M)
- F70N6:** Medio de criopreservación con ficoll (6% peso/volumen) y sacarosa (0.1M)
- F70R4:** Medio de criopreservación con ficoll (4% peso/volumen) y sacarosa (0.05M)
- F70R6:** Medio de criopreservación con ficoll (6% peso/volumen) y sacarosa (0.05M)
- D70N4:** Medio de criopreservación con dextrano (4% peso/volumen) y sacarosa (0.1M)
- D70N6:** Medio de criopreservación con dextrano (6% peso/volumen) y sacarosa (0.1M)
- D70R4:** Medio de criopreservación con dextrano (4% peso/volumen) y sacarosa (0.05M)
- D70R6:** Medio de criopreservación con dextrano (6% peso/volumen) y sacarosa (0.05M)

1. Introducción

A lo largo de los años, la aplicación de la inseminación artificial en conejos ha ido aumentando progresivamente en aquellos países en los que se practica la cría intensiva de esta especie. Las necesidades de producción han podido cubrirse realizando las inseminaciones artificiales con esperma fresco y refrigerado, almacenado durante un corto periodo de tiempo (menos de 36 horas; Viudes-de-Castro *et al.*, 1999; Roca *et al.*, 2000; Lopez-Gatius *et al.*, 2005). De esta forma se consiguen altas tasas de fertilidad y prolificidad logrando así satisfacer la demanda. No obstante, no disponer de un procedimiento de almacenamiento eficaz (criobancos de semen) dificulta de un lado la difusión de material genético y de otro la conservación *ex situ* de sus recursos genéticos. Con el objetivo de superar dicha limitación, se han estudiado los efectos de la criopreservación sobre el espermatozoide de conejo. La mayoría de autores que han llevado a cabo ensayos *in vivo* en este ámbito han experimentado las dificultades asociadas al uso del esperma de conejo criopreservado (menores tasas de fertilidad y/o prolificidad que el esperma fresco y refrigerado; Mocé y Vicente, 2009). Debido a esto, todavía hoy la criopreservación del esperma de conejo supone un desafío que promueve el desarrollo de nuevos protocolos y medios de criopreservación que se adapten mejor a las características del esperma de conejo.

1.1. Criopreservación.

La criopreservación es un proceso que se aplica a células y tejidos con el objetivo de preservar su viabilidad y funcionalidad el mayor tiempo posible. Esto se consigue deteniendo su metabolismo de modo que cualquier actividad biológica o bioquímica queda interrumpida de forma indefinida. Para ello reduce la temperatura hasta -196°C , utilizando sustancias crioprotectoras para evitar, tanto como sea posible, la formación de cristales intra y extracelulares y también los cambios osmóticos asociados al descenso de la temperatura.

1.1.1. Problemas de la criopreservación del esperma.

La aplicación de esta técnica al esperma resulta en un proceso a lo largo del cual los espermatozoides son sometidos a situaciones de estrés térmico, osmótico y mecánico, los cuales tienen lugar durante los pasos de dilución, equilibrado, enfriamiento, congelación y descongelación del semen (Andrabi, 2009). El periodo de equilibrado corresponde al momento en el que el esperma entra en contacto con el medio de criopreservación, justo antes de iniciar el protocolo de congelación. En este punto se produce la entrada al interior celular de las sustancias crioprotectoras permeables para establecer un equilibrio entre la concentración intra y extracelular dando lugar a cambios osmóticos del medio (Salomon y Maxwell, 2000). En la mayoría de las especies de mamíferos, durante la congelación y descongelación del esperma se producen la mayor parte de los daños en las células (principalmente debido a la formación de cristales de hielo intra y extracelulares), produciéndose pérdidas de motilidad y viabilidad, cambios morfológicos como daños acrosomales y alteraciones funcionales (Pacey *et al.*, 2009; Mocé y Vicente, 2009). Debido a esto la calidad del esperma desciende notablemente y con ello su capacidad fecundante.

Por otra parte, cabe remarcar que el éxito de la criopreservación varía considerablemente entre especies, entre individuos de una misma especie e incluso entre eyaculados de un mismo individuo, lo cual se atribuye a las diferencias en la composición de las membranas y características biofísicas de los espermatozoides (Thurston *et al.*, 2002). Esto pone de manifiesto lo complejo que puede llegar a ser establecer un protocolo de criogenización del esperma, ya no general para todas las especies, si no para una misma especie, y esperar que los resultados que se obtengan sean siempre los mismos.

La forma en que la especie y la variación entre individuos actúan como factores que influyen en la susceptibilidad del semen a sufrir daños durante el proceso de criopreservación ha sido descrita previamente (Holt, 2000; Leibo y Songsasen, 2002). En cuanto al efecto de la especie en la criopreservación, se ha observado que las relaciones colesterol:fosfolípidos y ácidos grasos poli-insaturados:saturados de los diferentes compartimentos de membrana espermáticos pueden favorecer el éxito en el proceso de criopreservación. Se ha demostrado que estos ratios, que varían según la especie, determinan la sensibilidad al enfriamiento, la permeabilidad a los crioprotectores así como la contribución o no del plasma seminal (Curry *et al.*, 2000). El esperma de humano, vacuno, ovino, caprino y de algunas aves de corral puede ser congelado con relativo éxito mientras que el de otras especies como son porcino, jabalíes, lagomorfos, roedores o marsupiales sufre graves daños pese a la utilización de protocolos específicos de especie (Lysa *et al.*, 2002; Pacey *et al.*, 2009). Por otra parte, la variabilidad de la calidad del esperma congelado-descongelado entre individuos ha sido también documentada en varias especies (Thomas *et al.*, 1997; Songsasen y Leibo, 1997; Thurston *et al.*, 2001; Thurston *et al.*, 2002). En estos estudios se realizaron inseminaciones heteroespérmicas con esperma congelado-descongelado las cuales hicieron visibles diferencias individuales que afectan a la fertilidad después de la criopreservación. En algunas especies ganaderas los centros de inseminación introducen entre sus protocolos de selección la catalogación de sus sementales como buenos y malos congeladores (Sellem *et al.*, 2015).

1.1.2. Ventajas de la criopreservación del esperma.

Entre los diversos motivos por los cuales la criopreservación del esperma es importante destacan: mantener la diversidad genética en las poblaciones de especies salvajes y domésticas (Critser y Russell, 2000), facilitar la difusión de líneas de especies domésticas que sean genéticamente superiores, preservar especies, razas o líneas animales en peligro de extinción (Mocé *et al.*, 2010), poder recuperar líneas animales valiosas en caso de que accidentalmente se pierdan (a causa de una enfermedad, por ejemplo). Además, la criopreservación del esperma puede ser una alternativa para el transporte de animales entre países, resolviendo problemas como el periodo de cuarentena (Liu *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista sanitario, la criopreservación del esperma permite realizar un análisis exhaustivo de las dosis para inseminación artificial antes de su comercialización (Mocé *et al.*, 2010), también puede aplicarse en tratamientos de infertilidad (Nalesnik *et al.*, 2004) o puede utilizarse para la creación de bancos genéticos de esperma de modelos animales genéticamente modificados para el estudio de enfermedades humanas (Critser y Russell, 2000). Además esta técnica es muy útil en los centros de inseminación artificial puesto que permite llevar a cabo por un lado la obtención del eyaculado y la preparación de la dosis para inseminar y por otro la realización de la inseminación artificial, lo cual supone un manejo más organizado y productivo de los animales y el personal (Mocé *et al.*, 2010).

1.2. Características del espermatozoide fértil.

Parte de la complejidad de tratar con espermatozoide se debe al hecho de que cada espermatozoide es una célula multicompartimental y que cada uno de sus componentes debe ser funcional para que éste sea capaz de fertilizar un ovocito. Cada espermatozoide debe poseer: la motilidad (Colenbrander *et al.*, 2003); las mitocondrias activas para suministrar la energía necesaria para la motilidad (Graham *et al.*, 1980); las membranas acrosomales intactas para que puedan experimentar los cambios característicos de la capacitación permitiendo de este modo la reacción del acrosoma en el momento correcto para facilitar a la célula espermática unirse a la zona pelúcida y la oolemma (Graham, 1996; Graham, 2001); las membranas plasmáticas que permiten la fusión con el oolemma (Amann, 2005) y un núcleo capaz de realizar una adecuada descondensación, reorganización nuclear, y un rendimiento genético apropiado para mantener el desarrollo embrionario y cigótico (Amann y Hammerstedt, 1993). Con todos estos atributos un espermatozoide puede lograr la correcta fecundación de un ovocito (Graham, 1996).

1.2.1. Evaluación de la calidad del espermatozoide. Capacidad fecundante.

Durante los últimos 75 años los investigadores han desarrollado ensayos de laboratorio para estudiar las características que ha de tener un espermatozoide para ser capaz de fertilizar un ovocito (Colenbrander *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 1980; Graham, 1996; Graham, 2001; Graham y Mocé, 2005), pero todavía se desconocen algunos de estos requisitos y la forma de evaluarlos. El principal problema es que la capacidad fecundante de un espermatozoide depende de muchos atributos, algunos de los cuales solo podrán ser realmente evaluados tras su interacción con el tracto reproductor de la hembra y el ovocito, y la mayoría de los ensayos *in vitro* que se realizan actualmente únicamente evalúan una o dos de las características, de forma que el espermatozoide puede ser correcto en un atributo pero deficiente en otros. Por lo tanto, esto conlleva a una sobreestimación del número de espermatozoides fértiles en una muestra de semen. Puesto que estos ensayos, para cada atributo medido, evalúan una parte representativa de la población de la muestra, combinar los resultados de dos o tres ensayos diferentes en la misma población de espermatozoides no determina el verdadero número de espermatozoides fértiles en una población. Para lograr esto, se debería evaluar, de forma simultánea en cada espermatozoide, todos los atributos necesarios para la fertilización, tal y como se representa en la figura 1.

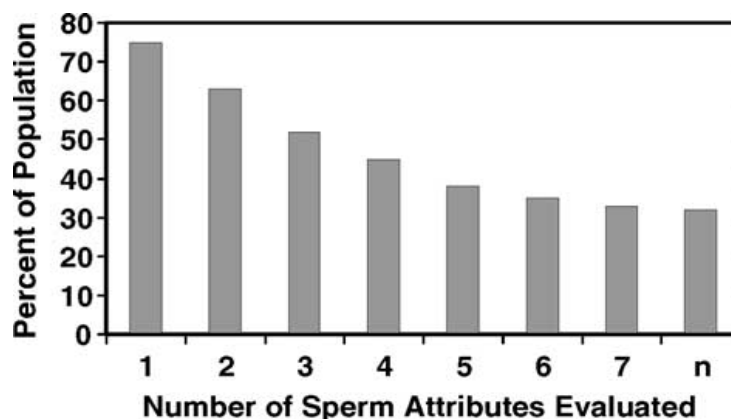


Figura 1. Hipotéticas subpoblaciones de espermatozoides consideradas como fértiles en una muestra de semen en función del número de atributos evaluados simultáneamente (Amann y Hammerstedt, 1993).

Para evaluar características de forma simultánea y a una parte representativa de la población de la muestra espermática, actualmente se dispone de la técnica de citometría de flujo. El citómetro permite que, una a una, las células previamente teñidas con marcadores fluorescentes para algunas de sus características o atributos, sean evaluadas (integridad de la membrana citoplasmática y acrosomal con SYBR Green y FICT-PNA respectivamente, por ejemplo). Es una técnica que aporta una gran sensibilidad, rapidez y versatilidad analítica al estudio de los espermatozoides y permite analizar de forma simultánea la viabilidad y el estado de los acrosomas de unos 50,000 espermatozoides por minuto (Graham y Mocé, 2005). Recientemente, se han incorporado a los sistemas de análisis de la motilidad espermática la capacidad de integrar análisis morfométricos y el marcaje fluorescente de algunas funciones como la viabilidad, integridad del acrosoma o funcionalidad mitocondrial. De esta forma puede llegarse a caracterizar en base a 3-4 características en subpoblaciones espermáticas de una misma muestra (Peña, 2015). Ello permite una mejora de la capacidad predictiva de la fertilidad espermática, aunque no suficiente, ya que no da una respuesta a la variabilidad de los resultados observados *in vivo*, de forma que no pueden establecerse correlaciones directas y claras entre los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro*. Desafortunadamente, ninguno de los parámetros evaluados *in vitro* aporta la suficiente información sobre la fertilidad real del espermatozoide (Graham y Mocé, 2005; Rodríguez-Martínez y Barth, 2007).

1.2.2. Correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*.

Los estudios realizados demuestran que las correlaciones entre los resultados obtenidos en el laboratorio y la fertilidad son inconsistentes (Graham *et al.*, 1980; Amann, 1989; Amann y Hammerstedt, 1993). Uno de los motivos por los que esto ocurre se debe a que el espermatozoide ha de poseer muchos atributos para fertilizar un ovocito, como se ha explicado previamente. Por otro lado, para la mayoría de estos atributos, no existe una graduación, desde un mínimo a un máximo, que afecta a la fertilidad, sino que, como ha sido demostrado, un espermatozoide debe poseer en un correcto estado cada atributo para ser capaz de fertilizar un ovocito (Amann y Hammerstedt, 1993). Por lo tanto, al evaluar específicamente un atributo del espermatozoide puede postularse que éste es o no propenso a tener una buena capacidad de fertilización, pero no puede determinarse si esa muestra será fértil.

Además hay muchas variables que tienen un marcado efecto sobre el resultado de la fertilidad, pero algunas de ellas no tienen nada que ver con el propio espermatozoide (Amann, 2005). Por último, para poder determinar de forma fiable la fertilidad de una muestra o de un medio de criopreservación es necesario realizar un número suficiente de inseminaciones (Amann, 2005).

A pesar de la dificultad que radica en correlacionar los datos de laboratorio con la fertilidad, la evaluación *in vitro* de la calidad del semen sigue siendo importante. Aunque los análisis de semen en el laboratorio no pueden predecir el potencial de fertilización real de una muestra de semen, el análisis puede predecir muestras de baja fertilidad y permitir la exclusión de esas muestras de un programa de inseminación artificial (Colenbrander *et al.*, 2003; Graham, 1996; Amann, 1989; Amann, 2005).

1.3. Criopreservación del espermatozoide de conejo.

1.3.1. Historia de la criopreservación del espermatozoide de conejo.

El desarrollo de los métodos de congelación de semen en el conejo se inició en los años cincuenta (Smith y Polge, 1950; Emmens y Blackshaw, 1950) pero no fue hasta la década de los sesenta cuando se comenzaron a realizar más publicaciones relacionadas con la criopreservación del espermatozoide de conejo. Los primeros estudios testaron el efecto de las sustancias que habían mostrado un carácter crioprotector en otras especies, como fueron el glicerol o la yema de huevo, quedando tempranamente descartado el glicerol, habitual en muchas otras especies como agente crioprotector permeable (Mocé y Vicente, 2009). Algunos autores demostraron que la criopreservación del espermatozoide de conejo mejora cuando se utilizan sustancias crioprotectoras con una mayor permeabilidad, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) o el etilenglicol, en lugar del glicerol (Fox y Burdick, 1963; Sawada y Chang, 1964).

Con los años, los datos arrojados por los estudios de criopreservación mostraron que el espermatozoide de conejo presenta unas características biofísicas que lo hacen muy sensible al tratamiento de congelación, de forma que la calidad del espermatozoide se ve gravemente afectada durante el proceso de criopreservación. Esto hizo que se adoptaran nuevas líneas de investigación, testando nuevos medios de criopreservación, nuevos agentes crioprotectores y diferentes concentraciones de estos. También se estudiaron nuevos protocolos de congelación, nuevas metodologías de inseminación *in vivo* e incluso nuevos materiales para la refrigeración, el congelado y el almacenamiento del semen de conejo.

1.3.2. Medios y agentes crioprotectores.

Existen diferentes variables que influyen en el éxito de la congelación del semen, tales como el medio de criopreservación, los agentes crioprotectores utilizados y su concentración, el sistema de almacenamiento del semen, el proceso de congelación y el de descongelación. De entre estos factores, el agente crioprotector utilizado tiene una importancia primordial puesto que es el encargado de minimizar el estrés físico y químico que sufren los espermatozoides durante la refrigeración, la congelación y la descongelación. Pero no una mayor concentración del crioprotector ni un mayor tiempo de exposición al mismo resulta en una mayor protección puesto que estas sustancias tienen un efecto tóxico en la célula produciendo el descenso de la motilidad, la desestabilización de la membrana y la desnaturalización de proteínas y enzimas (Rosato y Iaffaldano, 2013; Swain y Smith, 2010).

Los medios utilizados para congelar semen de conejo incluyen como crioprotectores la acetamida o el DMSO y en bastantes casos yema de huevo y un disacárido (sacarosa o trealosa). Sin embargo, por razones sanitarias, interesa eliminar los productos de origen animal de los medios de criopreservación (Thibier y Guerin, 2000) y que además son de composición desconocida, por lo que el medio no queda definido. En este sentido se llevaron a cabo diferentes estudios, algunos de los cuales consiguieron suplir la presencia de yema de huevo con la adición de sacarosa y DMSO a altos niveles (Sawada y Chang, 1964; Vicente y Viudes-de-Castro, 1996).

A diferencia de otras especies, la membrana plasmática de los espermatozoides de conejo presenta un ratio colesterol:fosfolípidos elevado y el ratio entre ácidos grasos poliinsaturados:saturados es bajo (Castellini *et al.*, 2006; Darin-Bennett y White, 1977). Estos ratios son importantes para conocer la naturaleza, la fluidez y el grado de empaquetamiento de la membrana de los espermatozoides. Altos niveles de colesterol resultan en una estructura más cohesiva, rígida e impermeable (Darin-Bennett y White, 1977). Por lo tanto, la membrana de estos espermatozoides presenta una baja permeabilidad al agua y una alta energía de activación debido a la estabilidad que proporciona el colesterol (Curry *et al.*, 1995). Esta baja permeabilidad al agua concuerda con la necesidad de usar sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular y una alta permeabilidad (tales como DMSO o amidas) para la criopreservación del espermatozoide de conejo (Curry *et al.*, 1995).

En los últimos años, la mayoría de los medios utilizados para la criopreservación del espermatozoide de conejo contienen un crioprotector permeable combinado con uno no-permeable para conseguir una mejor estabilización de la membrana durante el proceso de criopreservación (Mocé y Vicente, 2009). Las sustancias crioprotectoras no-permeables, tales como disacáridos (lactosa o trealosa) actúan principalmente como osmoprotectores y pueden mitigar los daños causados por los crioprotectores permeables. A concentraciones similares, las sustancias crioprotectoras no-permeables resultan menos tóxicas que las permeables, inhiben la formación de cristales de hielo, ayudan a reducir el estrés osmótico estabilizando las concentraciones internas de sustratos y disminuyen la cantidad de crioprotector permeable necesaria (Swain y Smith, 2010; Rosato y Iaffaldano, 2013). Por su parte, las sustancias crioprotectoras permeables aumentan la fluidez de la membrana, deshidratan parcialmente la célula, bajando de esta forma el punto de congelación y reduciendo el número y el tamaño de los cristales de hielo intracelulares formados, lo cual supone el principal factor biofísico de muerte espermática durante la criopreservación (Holt, 2000).

Muchos investigadores han centrado su atención en los efectos crioprotectores que tienen los componentes no-permeables del medio de criopreservación con un peso molecular más elevado que los disacáridos y los trisacáridos cuando se trabaja con espermatozoides y embriones (Dalimata y Graham, 1997; Shaw *et al.*, 1997; Kuleshova *et al.*, 2001). Se ha visto que la incorporación de polisacáridos (compuestos no permeables de gran peso molecular) reduce tanto los daños por la formación de cristales intra y extracelulares como el estrés osmótico derivado de los medios de criopreservación protegiendo la membrana celular durante el proceso de enfriamiento y congelación. Entre éstos se encuentra el polisacárido ficoll, un polímero altamente soluble y relativamente inerte (Suarez *et al.*, 1991).

El ficoll actúa como un agente crioprotector no permeable ya que afecta a la viscosidad del medio crioprotector y preserva las células mediante la reducción de la tensión mecánica, el recubrimiento de las células, la protección de la membrana celular y evitando la cristalización durante la congelación y la descongelación (Dumoulin *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1997; Kuleshova *et al.*, 2001). La acción crioprotectora del ficoll ha sido estudiada en espermatozoides de ratón (An *et al.*, 2000), sin embargo no resultó efectiva. En cambio, se ha utilizado con éxito en la criopreservación de embriones de ratón en estado de mórula y blastocisto (Kasai *et al.*, 1992; Papis *et al.*, 2005; Makarevich *et al.*, 2008a).

Recientemente se han realizado estudios de criopreservación de esperma de conejo con ficoll como segundo agente crioprotector no-permeable en un medio de congelación que contenía sacarosa como crioprotector no-permeable y DMSO como permeable y se ha visto que aumenta la viscosidad del medio y protege al esperma de conejo de los daños ocasionados durante la criopreservación (Kuliková *et al.*, 2014).

Otro polisacárido que despertó el interés en la comunidad científica por sus propiedades crioprotectoras fue el dextrano, polímero formado por la unión de moléculas de glucosa, altamente soluble, biocompatible y biodegradable. Inicialmente, en criopreservación, se utilizó para la conservación de glóbulos rojos (Ashwood-Smith *et al.*, 1971; Pellerin-Mendas *et al.*, 1997; Quan *et al.*, 2011) pero no mucho después se aplicó a la criopreservación del esperma, donde se testó el efecto crioprotector que tenía este polímero según su masa molecular (Schmehl *et al.*, 1986; Kundu *et al.*, 2002). Se ha visto que también actúa como un crioprotector no-permeable, aumentando la viscosidad del medio y con ello reduciendo los daños por estrés mecánico (Viudes-de-Castro *et al.*, 2010). Se ha utilizado, en combinación con DMSO, para la construcción de matrices 3D con el objetivo de favorecer el ensamblaje celular (Wang y Xu, 2010). La última aplicación de este polisacárido ha sido como crioprotector de células madre de la sangre del cordón umbilical (Chen *et al.*, 2016). Hasta ahora no se ha aplicado este polisacárido a un medio de congelación de esperma de conejo como agente crioprotector no-permeable por lo que estudiar su efecto crioprotector en esta especie será uno de los objetivos del presente trabajo.

1.3.3. Protocolos de congelación-descongelación.

De la misma forma que ocurre con los medios de criopreservación, no se ha establecido un protocolo único para la congelación y descongelación del esperma de conejo. Inicialmente trató de aplicarse el protocolo de criopreservación del esperma de vacuno a conejo pero se vio que no se conseguían buenos resultados por lo que fue necesario hacer una adaptación del protocolo a esta especie. En este sentido se han descrito muchos procedimientos distintos que, aunque todos se asemejan en los pasos seguidos durante el descenso de la temperatura, varían principalmente en los tiempos de aplicación, los materiales utilizados, las temperaturas aplicadas y las velocidades de descenso de las mismas. Estas variaciones se realizan con el objetivo de conseguir mantener en mejores condiciones el esperma para que, tras la descongelación, se conserve una elevada capacidad fecundativa.

En distintos estudios realizados se ha comprobado que, al contrario que en otras especies, enfriar el esperma de conejo desde 37 a 5°C puede llevarse a cabo tanto de forma rápida (Mocé y Vicente, 2002) como lenta (Parrish y Foote, 1986), obteniéndose en ambos casos unos resultados de fertilidad similares a los del esperma fresco. Esto se debe a que la membrana de los espermatozoides de conejo posee un ratio colesterol: fosfolípidos elevado que le aporta una mayor estabilidad (Castellini *et al.*, 2006; Darin-Bennett y White, 1977).

La mayoría de autores continúa el proceso de criopreservación enfriando el esperma en vapor de nitrógeno (-120°C) pero difieren en el tiempo de aplicación y el sistema de congelación utilizado (caja de congelación de poliestireno expandido o congelador programable automático) (Mocé *et al.*, 2003; Iaffaldano *et al.*, 2012; Kulikova *et al.*, 2014; Chen y Foote, 1994; Mocé *et al.*, 2015). Durante la etapa de enfriamiento del esperma se produce la mayor parte de la pérdida de la calidad del esperma y con ello, de su fertilidad (Mocé y Vicente, 2009). Por último, de forma común en todos los estudios, el esperma se introduce en nitrógeno líquido (-196°C) para finalizar así el proceso de criopreservación y proceder a su almacenamiento.

La fase de descongelación del esperma criopreservado es crítica para la fecundidad. La mayoría de autores la llevan a cabo en un baño de agua a 37-39°C, sin embargo, otros utilizan temperaturas más elevadas, reduciendo el tiempo de aplicación de las mismas (50°C, 12 segundos; Mocé *et al.*, 2003a). Los principales factores que se estudian para mejorar los resultados en esta fase son: la temperatura, los tiempos de aplicación de la misma y el material que se utiliza para almacenar el esperma. Estos factores han sido estudiados por diversos autores, tomando como parámetros de valoración la fertilidad y la prolificidad, para discernir el éxito del procedimiento (Chen y Foote, 1994; Mocé *et al.*, 2003b).

1.3.4. Problemas con la criopreservación de esperma de conejo.

Durante la criopreservación del esperma de conejo, de la misma forma que se ha visto que ocurre en otras especies en que se ha aplicado, éste es sometido a una situación de estrés (térmico, osmótico y mecánico) que conlleva una disminución del porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, una disminución de la motilidad y un descenso del porcentaje de células viables. Además, también se ha observado una corta longevidad, problemas con el transporte de los espermatozoides y el desarrollo de una capacitación prematura. Todo ello produce una disminución de la calidad espermática y esto se ve reflejado en una disminución de la fertilidad cuando este semen congelado-descongelado se aplica en inseminación artificial (Mocé y Vicente, 2009; Mocé *et al.*, 2010). Pese a los avances realizados, la posibilidad de inseminar con semen congelado-descongelado con fines productivos no es todavía factible a consecuencia de la variabilidad de los resultados, siendo sus tasas de fertilidad y prolificidad generalmente inferiores que las que se obtienen con semen fresco y refrigerado (Mocé y Vicente, 2009).

1.3.5. Fertilidad y prolificidad. Factores que influyen en los resultados.

La definición y medición de la fertilidad varía entre los distintos estudios. Puede considerarse como el porcentaje de hembras cuyos embriones son viables tras la fecundación, el porcentaje de hembras gestantes tras un determinado número de días, o el porcentaje de hembras que paren tras la inseminación (Colenbrander *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 1980; Graham, 1996; Graham, 2001; Amann, 2005). En cualquier caso, tanto la fertilidad como la prolificidad (tamaño de camada) son los datos más útiles y precisos que permiten caracterizar el estado del esperma. El factor limitante en muchos estudios es el número de inseminaciones necesarias para valorar de forma fiable la fertilidad, ya que, al ser una variable binomial, es necesario trabajar con un elevado número de datos. Por ello, han de inseminarse al menos 75 hembras para obtener una variación del 10% (Graham y Mocé, 2005).

Cuando se trabaja con esperma para realizar inseminaciones artificiales, los parámetros que realmente interesan y los que verdaderamente van a indicar la calidad del esperma son la fertilidad y la prolificidad (Graham y Mocé, 2005). De ahí que en los estudios en que se trabaja con semen criopreservado el objetivo sea lograr unas tasas de fertilidad y prolificidad tan semejantes como sea posible a las del esperma fresco. Pero el principal problema cuando se realizan inseminaciones artificiales con esperma criopreservado es la elevada variabilidad de los resultados obtenidos (Mocé y Vicente, 2009).

Entre los factores que provocan esta variabilidad en los resultados pueden encontrarse parámetros que dependen de la muestra de semen y que, algunos pueden detectarse en el análisis del mismo (la motilidad de las muestras, la resistencia a la criopreservación del esperma del macho donante, la concentración y el volumen del esperma introducido) y otros parámetros independientes del semen (el estado receptivo de las hembras inseminadas, la edad de las mismas, el tiempo que transcurre entre la inseminación y la ovulación, la competencia del inseminador y las condiciones de las granjas donde se encuentran las hembras) (Graham y Mocé, 2005; Mocé y Vicente, 2009).

2. Objetivo

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de los polisacáridos ficoll y dextrano en el medio de congelación espermática de conejo y evaluar cómo afectan tanto a la preservación de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) como a la motilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides.

3. Material y métodos

3.1. Diseño experimental.

El estudio se diseñó en dos fases experimentales, la primera se llevó a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), mientras que la segunda fase se realizó en las instalaciones experimentales del Centro de Investigación y Tecnología Animal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA).

3.1.1. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación *in vitro* sobre los parámetros seminales post-descongelación.

En esta primera fase se llevó a cabo un análisis *in vitro* de criopreservación de semen de conejo con el objetivo de testar el efecto de la incorporación de los polisacáridos ficoll y dextrano al medio de congelación. Se evaluaron 8 medios de congelación espermática que diferían en su concentración inicial de ficoll y dextrano (4 y 6% peso/volumen para ambos) y en su concentración de sacarosa (0,1M y 0,05M) frente a un medio estándar de congelación (MEC) sin polisacáridos y con 0,1 M de sacarosa. Para cada uno de ellos (9) se valoraron el porcentaje de espermatozoides post-descongelación que no sufrieron daños a nivel de membrana plasmática y acrosomal, así como las características cinéticas de los espermatozoides.

3.1.2. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.

A partir de los resultados del primer experimento se seleccionó uno de los medios que contenía dextrano y se comparó su fertilidad *in vivo* con el medio de congelación habitual tras aplicar dos procedimientos de congelación distintos (congelador programable frente a caja de congelación). De esta forma quedaron definidos 4 grupos de trabajo más un quinto grupo (control) constituido por conejas que fueron inseminadas con semen no congelado. Se evaluaron sus efectos a nivel de motilidad, de la membrana plasmática y acrosomal mediante citometría de flujo y, sobre la fertilidad y prolificidad mediante inseminación artificial.

3.2. Animales experimentales y condiciones ambientales.

Se utilizaron 35 machos adultos de la línea R de origen raza California que ha sido seleccionada por velocidad de crecimiento durante 36 generaciones y 256 conejas nulíparas de la línea A (origen Neozelandés) que ha sido seleccionada por tamaño de camada durante 42 generaciones. Los 25 machos donantes de semen del experimento 1 estuvieron alojados en las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la UPV, mientras que los otros 10 machos donantes de semen y las 256 conejas fueron alojados en las instalaciones del Centro de Investigación y Tecnología Animal (Segorbe-IVIA). Todos los animales fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones ambientales controladas: temperatura media diaria mínima de 17.5°C y máxima de 25.5°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y acceso libre a agua y pienso comercial (17.5% de proteína cruda, extracto de éter 3.5%, 16.7% de fibra cruda, 2938 kcal / kg sobre materia seca).

3.3. Recolección del semen.

La obtención de las muestras de semen para el estudio se realizó haciendo uso de una vagina artificial y colectando las muestras de cada macho por separado. La vagina artificial es un dispositivo que trata de proporcionar al pene los estímulos térmicos y mecánicos necesarios para que la eyaculación se produzca. Consta de un cuerpo semirrígido, un revestimiento interno o camisa y un colector del eyaculado (figura 2). El cuerpo es un cilindro con dos aberturas terminales. En una de ellas se sitúa un tubo colector, mientras que la otra permite la introducción del pene del conejo y la eyaculación. Este cilindro dispone de un orificio que permite la introducción de agua caliente. La camisa es otro cilindro de látex más largo que el cuerpo, de forma que, una vez introducido en él, se puedan revertir los bordes. De este modo se forma una cavidad cerrada entre el cuerpo y la camisa destinada a contener agua caliente. El colector es un tubo estéril de diámetro ajustado a la abertura más estrecha del cuerpo.



Figura 2. Materiales para armar la vagina artificial



Figura 3. Vagina artificial armada

Para la colección, la vagina armada se mantuvo a 50°C para estimular la eyaculación y evitar que la muestra recogida contuviese orina puesto que una temperatura inferior estimula la micción (figura 3). Una vez obtenidas las muestras fueron transportadas al laboratorio en un recipiente aislante para protegerlas frente a cambios de temperatura. La colección de muestras se realizó dos veces por semana durante un mes y medio.

3.4. Evaluación inicial del semen.

En cada tanda de colección, únicamente aquellos eyaculados de color blanco y una motilidad estimada superior al 70% se consideraron como aptos para constituir una mezcla heterospérmica de la cual, posteriormente, se determinó su concentración, motilidad, viabilidad porcentaje de anomalías morfológicas y daños en acrosoma. Para proceder al estudio de las muestras primero se retiró el gel en aquellas en las que estaba presente. Una vez realizado esto se procedió a evaluarlas a 37°C, haciendo uso de un microscopio de contraste de fases a 200x con platina termostatada. Para ello se preparó una alícuota de 20 µL del eyaculado diluida en relación 1:10. El diluyente utilizado para todas las muestras y valoraciones fue Tris-ácido cítrico-glucosa (TCG; Viudes-de-Castro *et al.*, 1999) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA; 3 mg/ml). En este análisis preliminar *de visu*, las muestras que tenían una motilidad superior al 70%, y no se observaban aglutinaciones de espermatozoides ni un número elevado de espermatozoides anormales (cabezas sueltas, presencia de dos colas, colas enroscadas, piezas intermedias dobladas y cabezas anormales) pasaron a formar parte de la mezcla heterospérmica.

De cada mezcla heterospérmica (originada a partir de los distintos eyaculados seleccionados) se tomó una alícuota (sin diluir) para evaluar las características en fresco y el resto se congeló siguiendo el protocolo que se describe más adelante. Para las muestras frescas y congeladas-descongeladas se prepararon las siguientes diluciones con las que se realizaron las evaluaciones de sus características:

- 20 µL de muestra diluida 1:10 en TCG-BSA para la valoración de motilidad y viabilidad.
- 20 µL de muestra diluida 1:20 en glutaraldehído para el análisis de la integridad acrosomal, la concentración y el porcentaje de anormales (estos dos últimos parámetros solo se evaluaron en el semen fresco).

Si realizado el espermiograma que se describe a continuación, la muestra heterospérmica (en fresco) tenía una motilidad inferior al 70%, un porcentaje de espermatozoides anormales superior al 25% o un porcentaje de acrosomas intactos inferior al 75% quedaba descartada para su congelación en los experimentos 1 y 2.

3.5. Análisis de los parámetros seminales.

3.5.1. Determinación de la concentración.

A partir de una muestra de la mezcla heterospérmica diluida 1:20 en glutaraldehído se realizó la determinación de la concentración de la misma. Para ello se utilizó contraste de fases negativo en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) con el objetivo de 400x. La muestra se colocó en una cámara cuenta glóbulos Thoma y se cuantificó el número de espermatozoides en base a las indicaciones del fabricante. Previamente a la realización del contaje, se dejó la muestra 2 minutos en reposo una vez colocada en la cámara para que así todos los espermatozoides se situasen en el mismo plano de visión.

3.5.2. Análisis morfológicos.

Mediante los análisis morfológicos se determinó tanto el estado de los acrosomas como el porcentaje de espermatozoides normales presente en la muestra. Con el fin de determinar el estado de los acrosomas se utilizó la mezcla heterospérmica diluida 1:20 en glutaraldehído, la cual se observó mediante microscopía de contraste de fases negativa con un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) visualizando con el objetivo de 400x. Se contaron entre 150 y 200 espermatozoides y se determinó el estado del acrosoma (intacto o dañado, figura 4).

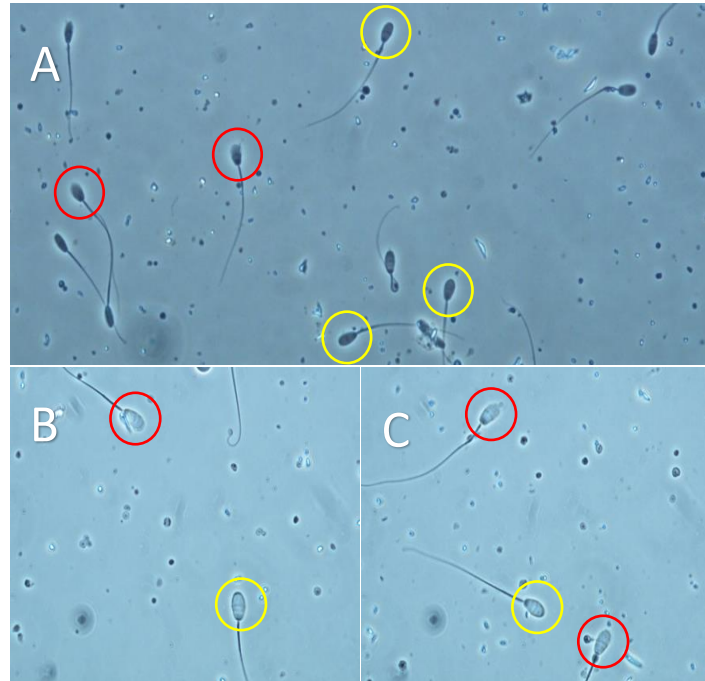


Figura 4. Evaluación del estado de los acrosomas. En rojo los acrosomas dañados (presentan la membrana difusa), en amarillo los intactos (se observa la membrana nítida). Imagen A tomada a 400x; imágenes B y C tomadas a 1000x.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de acrosomas intactos (número de espermatozoides con el acrosoma intacto x 100 / número total de acrosomas evaluados).

El análisis morfológico se completó determinando el porcentaje de espermatozoides normales presentes en la muestra, haciendo uso de la misma preparación y el mismo método de visualización que el empleado en la determinación del estado de los acrosomas. Se contabilizaron entre 150 y 200 espermatozoides y se clasificaron en normales y anormales (cabezas sueltas, presencia de dos colas, colas enroscadas, piezas intermedias dobladas y cabezas anormales; figura 5).

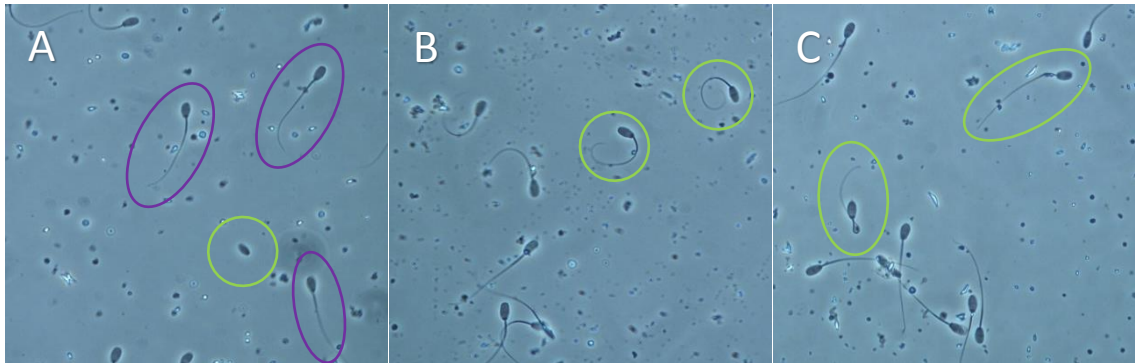


Figura 5. Análisis del estado morfológico de los espermatozoides. En verde se observan los que presentan una morfología anormal; en púrpura los considerados como normales. Las tres imágenes (A, B, C) han sido tomadas a 400x.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de espermatozoides normales (número de espermatozoides con morfología normal x 100 / número total de espermatozoides contados).

3.5.3. Análisis de la viabilidad.

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

La tinción se realizó añadiendo 2.5 μ L de SYBR-14 (previamente diluido 1:100 con DMSO) y 2.5 μ L de yoduro de propidio (IP; diluido 1:100 con TCG) a 200 μ L de mezcla heterospermica diluida 1:10 en TCG-BSA. Tras esto se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de su valoración. Durante todo este proceso y su posterior observación se trabajó en oscuridad para así evitar la pérdida de intensidad de la fluorescencia.

Para su visualización se utilizó microscopía de fluorescencia usando un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) observando a 400x. Para la evaluación se utilizaron diferentes filtros. Se empleó el filtro G-2A con una longitud de onda de excitación de 510-560 nm y emisión a 575-590 nm, para hacer visibles las células dañadas teñidas con IP (rojo) y el filtro B-2A con una longitud de onda de excitación de 450-490 nm y emisión a 505-520 nm para observar, con fluorescencia verde, las células viables teñidas con SYBR-14 (figura 6).

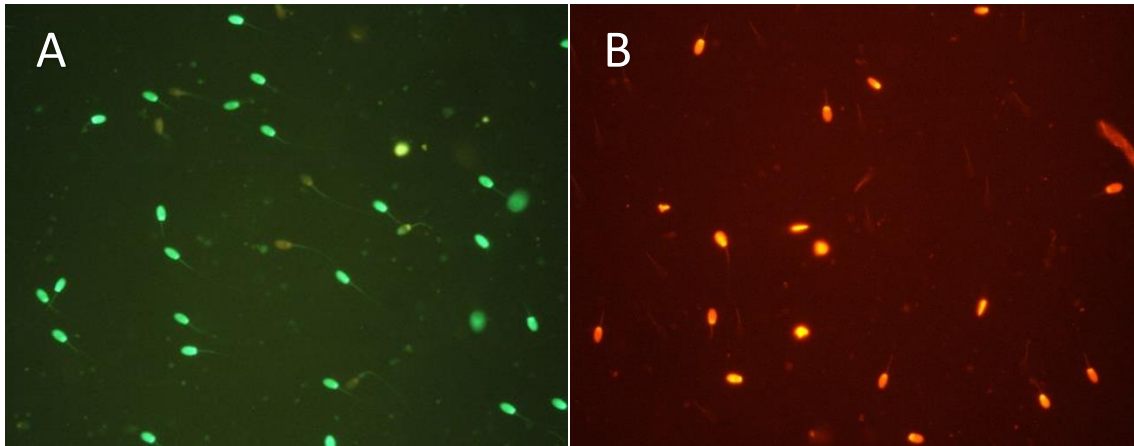


Figura 6. Imagen A, tomada a 400x con el filtro B-2A, se observan las células viables. Imagen B, tomada a 400x con el filtro G-2A, se observan las células no-viables.

Se realizó un recuento en distintos campos hasta obtener un total de 150-200 espermatozoides para obtener unos datos representativos de la muestra y con ellos se calculó el porcentaje de viabilidad (número de espermatozoides viables x 100 / número espermatozoides totales).

3.5.4. Análisis de la motilidad.

Para caracterizar la motilidad se hizo uso de un microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) , una cámara Makler (Sefi- Medical Instruments, Haifa, Israel) y del sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) que permite una evaluación objetiva de la motilidad seminal (Sperm Vision™; MiniTube, Tiefenbach, Alemania) (figura 7). El análisis de cada muestra se realizó con la mezcla heterospérmica diluida 1:10 en TCG-BSA y en platina termostatada a 37°C.

Con el objetivo de 100x se tomaron 6 videos con 30 imágenes por segundo para registrar, al menos, 200 espermatozoides de cada mezcla heterospérmica, medio ensayado y procedimiento de congelación (según experimento). A partir del análisis de los mismos se recogieron los datos de porcentaje de motilidad total (motilidad > 5 m/s), velocidad curvilínea (VCL; distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$)), velocidad media (VAP; distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media de circulación en el periodo de observación ($\mu\text{m/s}$)), índice de linealidad (LIN; es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea. $\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$) y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, (μm)). De esta forma quedó caracterizada la motilidad para cada una de las muestras.

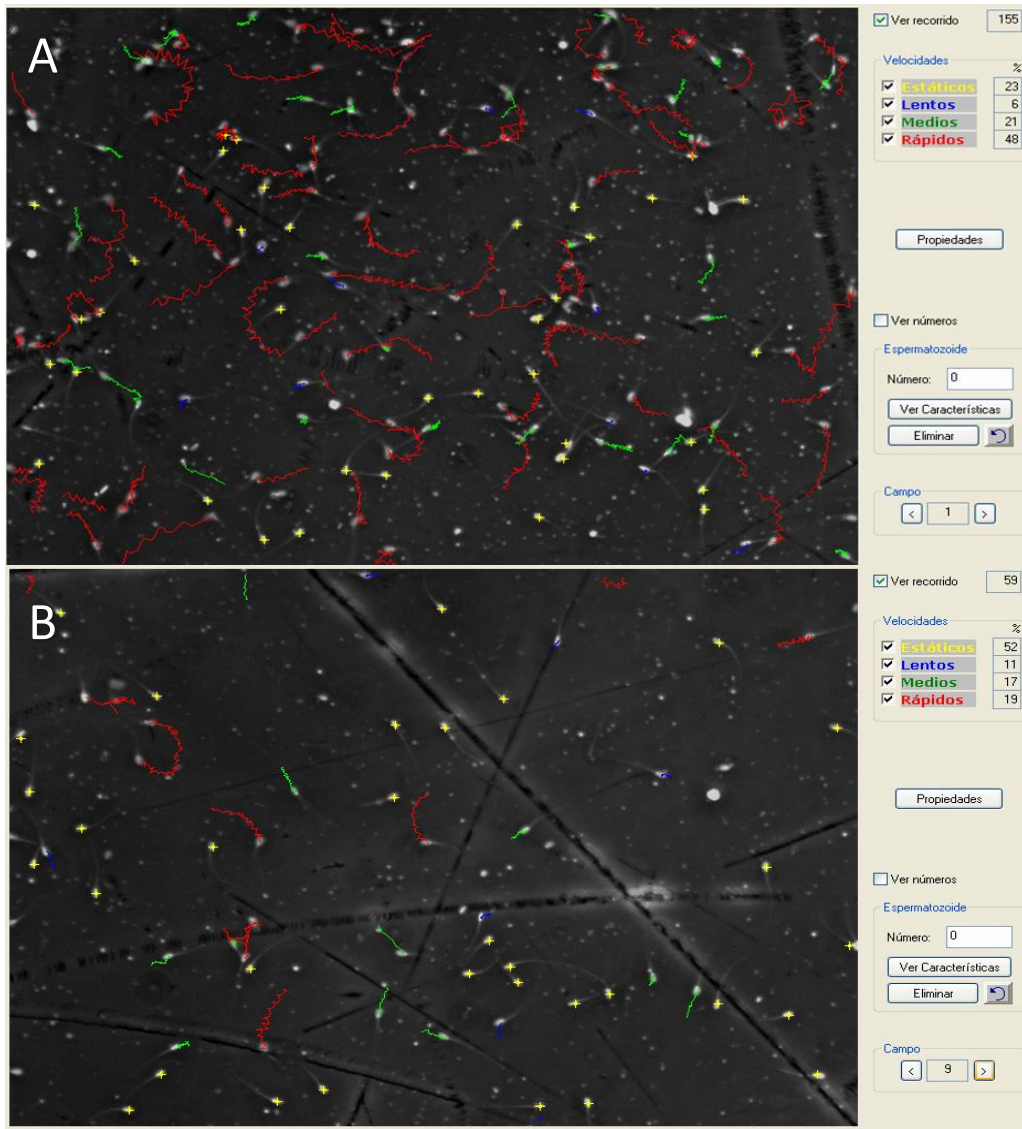


Figura 7. Imágenes de las trayectorias espermáticas analizadas por el sistema CASA. Imagen A, mezcla heterospermica en fresco. Imagen B, mezcla heterospermica congelada-descongelada.

3.6. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación *in vitro* sobre los parámetros seminales post-descongelación.

3.6.1. Medios de congelación ensayados.

Para poder testar el efecto del dextrano y el ficoll en el medio de congelación del semen se trabajó con 9 medios de distinta composición. Estos medios diferían entre sí en la concentración de sacarosa, en el polisacárido incluido y en la concentración del mismo. La composición de los medios estudiados se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición inicial de los medios de congelación estudiados.

Componentes	Medios								
	Control	D70 N4	D70 N6	D70 R4	D70 R6	F70 N4	F70 N6	F70 R4	F70 R6
Sacarosa (g) (PM 342.3)	3.42	3.42	3.42	1.71	1.71	3.42	3.42	1.71	1.71
DMSO (mL) 3M (PM 78.13)	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3	21.3
Dextrano (g) (PM 70)	0	4	6	4	6	-	-	-	-
Ficoll (g) (PM 70)	0	-	-	-	-	4	6	4	6

Dextrano (D), ficoll (F), concentración alta (N) o baja (R) de sacarosa y concentración alta (6) o baja (4) de polisacárido.

Para cada medio se añadió diluyente TCG-BSA hasta enrasar a 100 mL, se determinó el pH (en todos los casos oscilaba entre 6.8 y 6.9) y se estimó la osmolaridad de los medios, la cual se situó entre 3700 y 4000 mOsmKg⁻¹. Como medio estándar de congelación se consideró el utilizado en varios estudios como medio habitual, definido por el grupo de investigación en 1996 y que ha venido siendo utilizado en diferentes estudios, el cuál no incluye ningún polisacárido en su composición (Vicente y Viudes-de-Castro, 1996; Viudes-de-Castro y Vicente, 1996; Viudes-de-Castro *et al.*, 1999; Mocé *et al.*, 2003b; Lavara *et al.*, 2005; Mocé y Vicente, 2009; Kulikova *et al.*, 2014). Tanto para el dextrano como para el ficoll se testaron 4 medios combinando la concentración alta (N) o baja (R) de sacarosa con la concentración alta (6) o baja (4) de polisacárido dando lugar a cuatro combinaciones posibles para cada polisacárido (N4, N6, R4, R6).

3.6.2. Protocolo de congelación.

El protocolo de congelación utilizado en este experimento se basa en un procedimiento habitual descrito por distintos autores (Dalimata y Graham, 1997; Mocé *et al.*, 2003; Iaffaldano *et al.*, 2012; Kulikova *et al.*, 2014), brevemente:

Cada mezcla heterospérmica se dividió en nueve alícuotas y se realizó una dilución 1:1 con cada uno de los medios. A continuación se cargaron en pajuelas de plástico de 0,25 mL (MINITÜB, Labortetechnik GmbH y Co., Tiefenbach, Alemania), llenando al menos 3 pajuelas por medio para tener suficiente muestra para evaluar tras la congelación. Tras ser cargadas, las pajuelas se cerraron con alcohol polivinílico (IMV TECHNOLOGIES, ref 018815, Saint Ouen sur Iton, Francia) el cual forma un tapón en el extremo. Seguidamente se inició el proceso de criopreservación, colocando las pajuelas en una gradilla metálica y enfriándolas a 5°C durante 45 minutos en un refrigerador programado a dicha temperatura. Posteriormente se procedió a colocar la gradilla metálica en vapor de nitrógeno (alrededor de -120°C). Para ello se utilizó una caja de congelación en la que se introdujo nitrógeno líquido a 5 cm por debajo del nivel en que se situaba la gradilla (tal y como se muestra en la figura 8) durante 10 minutos. A lo largo de este proceso las pajuelas presentaban toda su superficie libre para permitir una correcta transmisión de la temperatura. Por último se vertieron las pajuelas en el nitrógeno líquido alcanzando así las mismas una temperatura de -196°C y quedando preparadas para su almacenamiento.



Figura 8. Caja de congelación con gradilla para el soporte de las pajuelas.

3.6.3. Protocolo de descongelación del semen.

Para descongelar las pajuelas se introdujeron en un baño de agua a 50°C y se agitaron durante 10 segundos (Mocé *et al.*, 2003; Iaffaldano *et al.*, 2012). El contenido de las mismas fue vertido en microtubos cortando los tapones de ambos extremos quedando preparada la muestra para el análisis post-descongelación del semen. Este proceso se realizó individualmente con cada pajuela.

3.6.4. Evaluación de los parámetros seminales post-descongelación.

A las muestras de semen congeladas-descongeladas se les realizó el análisis de la motilidad, viabilidad y el análisis morfológico del estado del acrosoma siguiendo los protocolos correspondientes descritos previamente. Todos los datos obtenidos fueron recogidos para su posterior análisis estadístico.

3.7. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.

3.7.1. Medios de congelación ensayados.

En esta segunda fase experimental se estudiaron dos factores, la capacidad fecundante *in vivo* de los medios de criopreservación (MEC y D70N6) y las diferencias entre 2 protocolos de congelación, quedando así definidos 4 grupos experimentales. Únicamente se trabajó con 2 medios debido a que la cantidad de hembras disponibles para ser inseminadas era un factor limitante puesto que es necesario inseminar más de 50 conejas por medio para detectar diferencias de fertilidad superiores al 15% y de más de un gazapo en la prolificidad de las conejas inseminadas.

3.7.2. Protocolo de criopreservación del semen.

Para llevar a cabo el segundo experimento se establecieron dos métodos distintos de criopreservación del semen. El primero de ellos es el descrito previamente en el experimento 1, basado en la utilización de una caja de congelación, mientras que en el segundo se utilizó un congelador programable automático (Mini-Digitcool, IMV Technologies; Mocé *et al.*, 2015; figura 9).

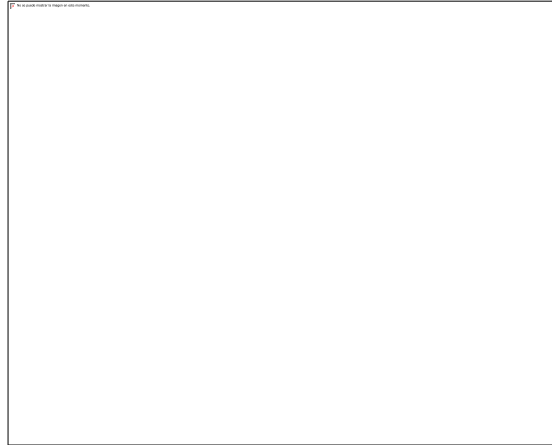


Figura 9. Congelador programable automático

Este sistema de congelación permite establecer una rampa programable de descenso de la temperatura. De la misma forma que en el primer protocolo, las pajuelas fueron refrigeradas durante 45 minutos. Tras esto, fueron congeladas desde 5°C hasta -6°C a una velocidad de -5°C min⁻¹ (Chen y Foote, 1994). A continuación se bajó la temperatura de -6°C a -100°C a una velocidad de -40°C min⁻¹ y se mantuvieron a -100°C durante 30 segundos. El siguiente descenso de temperatura se produjo a una velocidad de -70°C min⁻¹ desde -100°C hasta -150°C y finalmente se introdujeron en nitrógeno líquido para su almacenamiento (Mocé *et al.*, 2015).

Para la descongelación del semen se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el experimento 1.

3.7.3. Citometría de flujo.

Las muestras de semen con las que se realizaron las inseminaciones fueron caracterizadas. Se determinó su concentración siguiendo el protocolo previamente descrito pero tanto el análisis de viabilidad como el de morfología se llevaron a cabo mediante citometría de flujo.

3.7.3.1. Determinación de la viabilidad mediante citometría de flujo.

El porcentaje de espermatozoides viables en cada muestra se determinó usando la tinción fluorescente dual SYBR-14/IP. Todas las muestras fueron diluidas hasta una concentración de 30 x 10⁶ espermatozoides/mL con el diluyente atemperado (TCG-BSA). Las muestras se tiñeron para el análisis de citometría de flujo transfiriendo alícuotas de 0.1 mL de muestra a tubos que contenían 0.45 mL de TCG, 2.5 mL de SYBR-14 (solución 10 mM en DMSO) y 2.5 mL de IP (solución 1.5 mM en agua purificada). Se incubaron (10 minutos a 22°C) y se filtraron a través de una malla de nylon (para eliminar fragmentos celulares y desechos) y se analizaron usando un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España) equipado con un láser iónico de argón (15-mW488-nm argon ion laser; Cyonics; Coherent, Santa Clara, CA, USA) y el software EXPO 2000 (Coulter Corporation).

La fluorescencia verde del SYBR-14 se detectó usando un filtro de 550 nm combinado con otro filtro (FL1) de 525 nm (ancho de banda 505-545 nm). De igual forma, la fluorescencia roja del IP se detectó usando un filtro de 645 nm combinado con un filtro (FL3) de 620 nm (ancho de banda 605-635 nm). El valor fotomultiplicador del detector para FL1 se fijó a 650 V, mientras que para FL3 se fijó a 691 V. Se analizó un mínimo de 10,000 espermatozoides por muestra y en cada

análisis se detectaron 4 subpoblaciones de espermatozoides (figura 10): espermatozoides vivos (A1), espermatozoides en apoptosis (A2), partículas (A3) y espermatozoides muertos (A4). En los resultados solo se consideró el porcentaje de espermatozoides vivos (SYBR-14 positivos y IP negativos) (Viudes-de-Castro *et al.*, 2014; Petrunkina y Harrison 2010; Petrunkina *et al.* 2010; Mocé *et al.*, 2015).

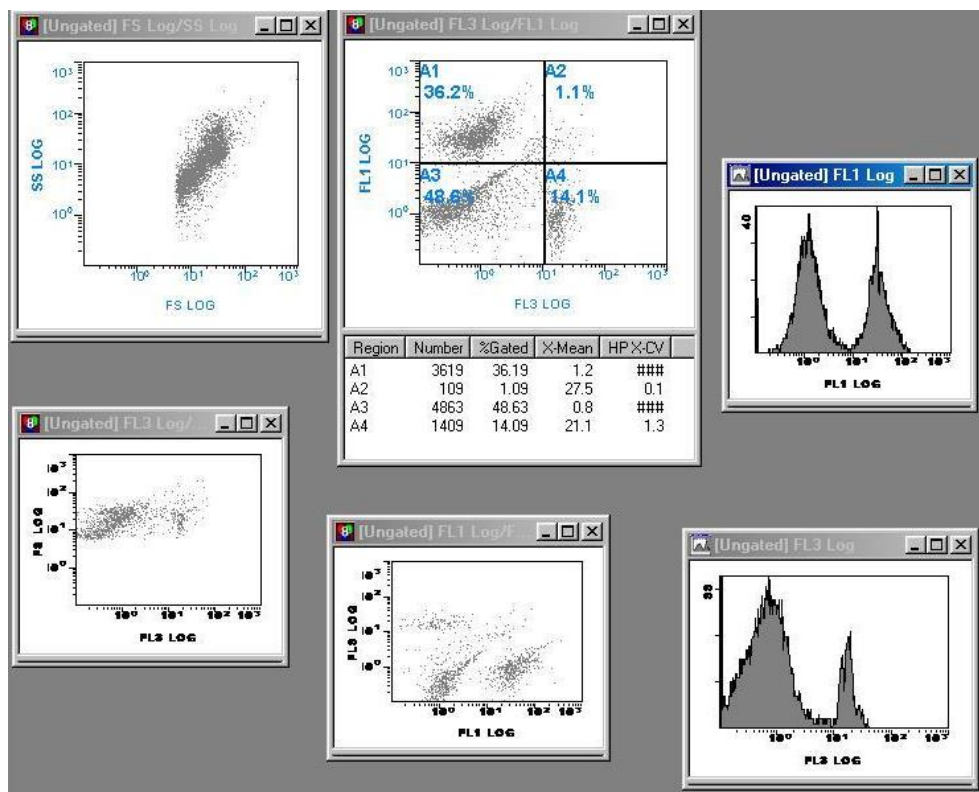


Figura 10. Datos y gráficos obtenidos en el análisis de la viabilidad espermática mediante Citometría de flujo.

3.7.3.2. Determinación del estado de los acrosomas mediante citometría de flujo.

El estado de los acrosomas en cada muestra se determinó utilizando una tinción dual formada por FITC-PNA/IP. Las muestras diluidas se tiñeron transfiriendo alícuotas de 0.1 mL en tubos que contenían 0.45 mL de TCG, 1.5 mL de lectina marcada con fluoresceína (FITC-PNA, solución a 1 mg/mL en solución salina) y 2.5 mL de IP (solución 1.5 mM en agua purificada). Las muestras teñidas se incubaron (10 minutos a 22°C) y se filtraron usando una malla de nylon de 40 mm (para eliminar fragmentos celulares y desechos).

La fluorescencia se midió usando un sensor FL-1, un filtro de 525 nm para detectar el FITC-PNA, un sensor FL-2 y un filtro de 575 nm para detectar el IP. Como se muestra en la figura 11, se detectaron cuatro subpoblaciones de espermatozoides: muertos con el acrosoma intacto (C1), muertos con el acrosoma reaccionado (C2), vivos con el acrosoma intacto (C3) y vivos con el acrosoma reaccionado (C4). Se calculó el porcentaje de acrosomas intacto como la proporción de espermatozoides vivos con el acrosoma sin reaccionar (Casares-Crespo *et al.*, 2016).

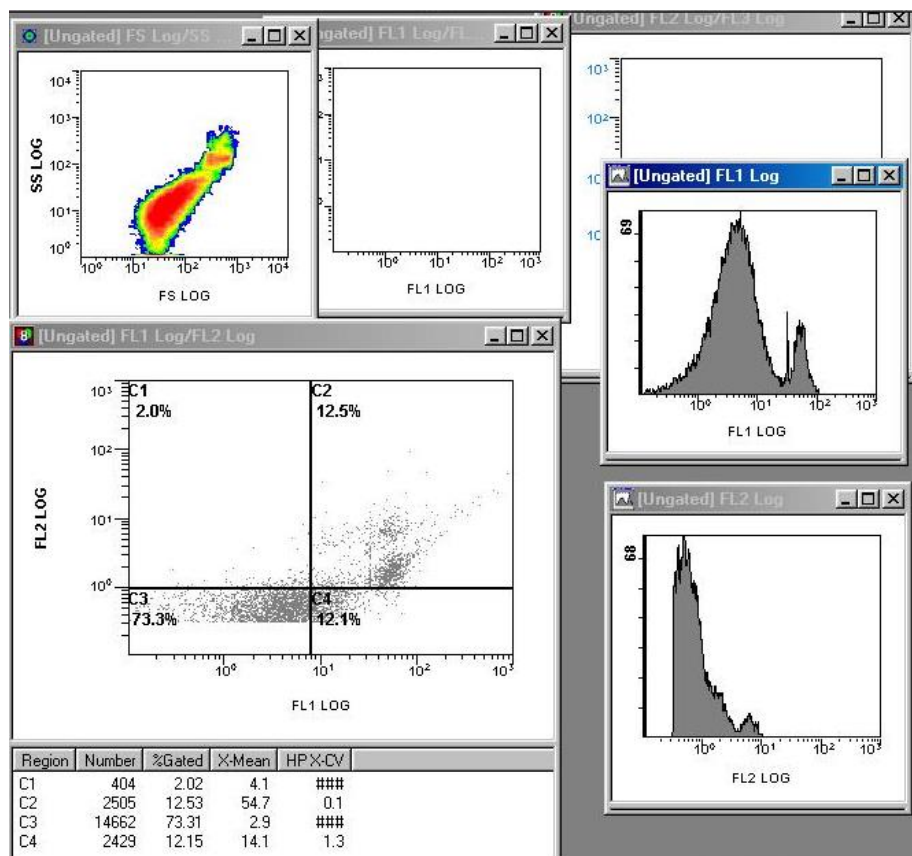


Figura 11. Datos y gráficos obtenidos en el análisis del estado de los acrosomas mediante citometría de flujo.

3.7.4. Inseminación artificial.

Para el estudio de la fertilidad y prolificidad de los medios de crioconservación seleccionados se realizaron 256 inseminaciones. Las inseminaciones se llevaron a cabo con una pipeta curvada de plástico (22 cm de largo y 0.5 mm de diámetro; vaina francesa de inseminación). Inmediatamente tras la inseminación se indujo la ovulación inyectando intramuscularmente 1µg de acetato de buserelina (Suprefact, Sanofi-aventis, S.A, Barcelona, España).

Para las inseminaciones con semen fresco, considerado como control, se introdujeron 0.5 mL a una concentración de 20 millones de espermatozoides / mL. En cambio, para el semen congelado-descongelado se trabajó con 0.5 ml de muestra a una concentración de 40 millones de espermatozoides / mL. Para obtener estas concentraciones para un mismo volumen (0.5 mL) se diluyó (TCG-BSA) hasta la concentración deseada la muestra fresca y la descongelada.

Tras el parto se contabilizó el número de gazapos nacidos vivos, el número de los que nacieron muertos y el número total de nacidos.

3.8. Análisis estadístico.

Los parámetros seminales de las muestra post-descongelación fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado que incluyó, en el experimento 1, como efecto fijo el medio de congelación (9 medios) y como covariable el parámetro correspondiente obtenido de la mezcla heterospérmica analizada, mientras que en el experimento 2 se incluyó como efecto fijo el medio de congelación (MEC y D70N6), el protocolo de congelación (congelador programable y caja de congelación) y su interacción y como covariable el parámetro correspondiente obtenido de la mezcla heteróspermica analizada.

La fertilidad al parto se analizó por medio de una función binomial probit_link, en la que se utilizó como efecto fijo los 5 grupos experimentales (control fresco, MEC prog, MEC caja, D70N6 prog, D70N6 caja). Se asignaron valores binomiales a la fertilidad, de modo que las conejas inseminadas que llegaron a parir recibían un valor de 1, y aquellas que no parieron, un valor de 0. Se realizó un análisis de la varianza usando un modelo lineal general en el que se incluyó como efecto fijo los 5 grupos experimentales (control fresco, MEC prog, MEC caja, D70N6 prog, D70N6 caja).

Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002).

4. Resultados

4.1. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación *in vitro* sobre los parámetros seminales post-descongelación.

4.1.1. Mezclas heterospérmicas incluidas en el estudio.

Las tablas 2 y 3 muestran las características de cada una de las mezclas heterospérmicas utilizadas para evaluar los 9 medios de congelación. En estas se incluyen los valores de los porcentajes de viabilidad, acrosoma no reaccionado, espermatozoides con morfología normal y motilidad, así como los parámetros cinéticos, velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN) y desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Todos ellos fueron incluidos como covariables en los respectivos análisis sobre los parámetros post-descongelación del espermatozoides.

Tabla 2. Valores de los parámetros (no-cinéticos) de las mezclas heterospérmicas incluidas en el experimento 1.

Mezclas heterospérmicas	Concentración (mill spz/mL)	% Viabilidad	% Acrosoma no reaccionado	% Normales
1	396	80.0	98.0	92.0
2	352	80.4	96.0	93.0
3	504	83.5	84.7	83.6
4	260	90.0	75.0	84.2
5	512	87.0	87.7	85.9
6	270	75.6	78.9	81.0
7	780	79.7	96.0	77.7

Tabla 3. Valores de los parámetros (cinéticos) de las mezclas heterospérmicas incluidas en el experimento 1.

Mezclas heterospérmicas	% Motilidad	VCL	VAP	LIN	ALH
1	88	90.8	59.2	43.8	2.8
2	70	68.2	37.3	29.9	2.6
4	88	97.6	51.6	27.2	3.3
5	77	82.6	51.1	39.6	3.0
6	77	80.3	42.5	28.3	2.8
9	75	93.1	54.7	35.9	3.2
10	78	97.3	50.6	25.6	2.9

VCL: velocidad curvilínea, VAP: velocidad media, LIN: índice de linealidad, ALH: desplazamiento lateral de la cabeza.

Las mezclas heterospérmicas utilizadas muestran valores seminales similares a los de estudios previos sobre calidad seminal y criopreservación de semen de conejo (Castellini *et al.*, 2006; Rosato y Iaffaldano, 2011; Iaffaldano *et al.*, 2012; Casares-Crespo *et al.*, 2016).

4.1.2. Efecto de los medios de criopreservación sobre los parámetros no-cinéticos del esperma post-descongelación.

Los medios de criopreservación protegieron diferencialmente la membrana acrosomal (figura 12). Los datos muestran que los medios que presentaban los niveles más elevados de dextrano, ficoll y sacarosa tienden a proteger mejor dicha membrana, aunque ninguno de ellos ha mejorado los resultados del medio estándar de congelación (MEC). Pudo observarse que la reducción del contenido de sacarosa tiende a empeorar la conservación post-descongelación de la membrana acrosómica (medio D70R4, D70R6, F70R4 y F70R6). El coeficiente de la covariable (% acrosoma intacto en el semen fresco) fue de 1.37 ± 0.124 .

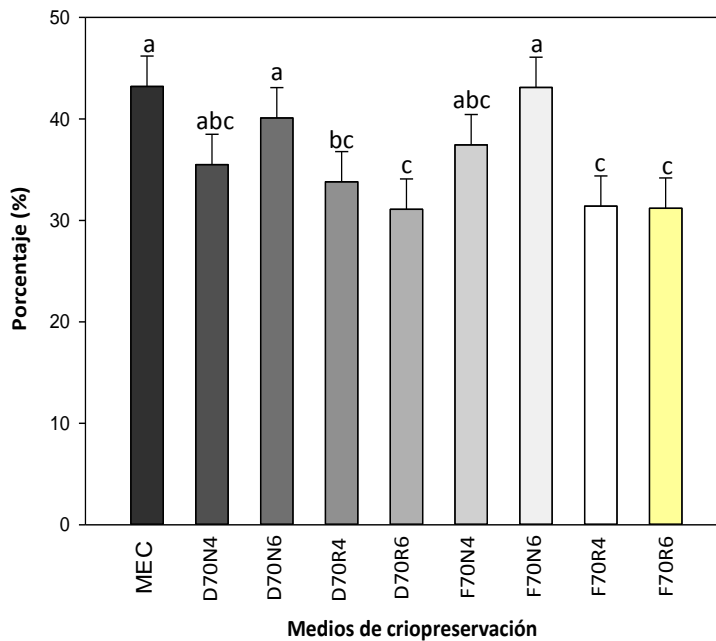


Figura 12. Porcentaje de acrosomas intactos post-descongelación en función del medio de criopreservación. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar). Barras con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

La viabilidad espermática post-descongelación, determinada por la integridad de la membrana plasmática, resultó afectada de diferente forma en función del medio de congelación utilizado (figura 13). En este caso, los medios D70N4, D70N6, F70N4, F70N6 y F70R6 mostraron similares resultados al MEC. También se apreció que la reducción del contenido de sacarosa en los medios (D70R4, D70R6, F70R4) tiende a empeorar la conservación post-descongelación de la membrana plasmática, a excepción del medio F70R6, cuyos resultados fueron similares al MEC. El coeficiente de la covariable (viabilidad del esperma fresco) fue de -0.58 ± 0.145 .

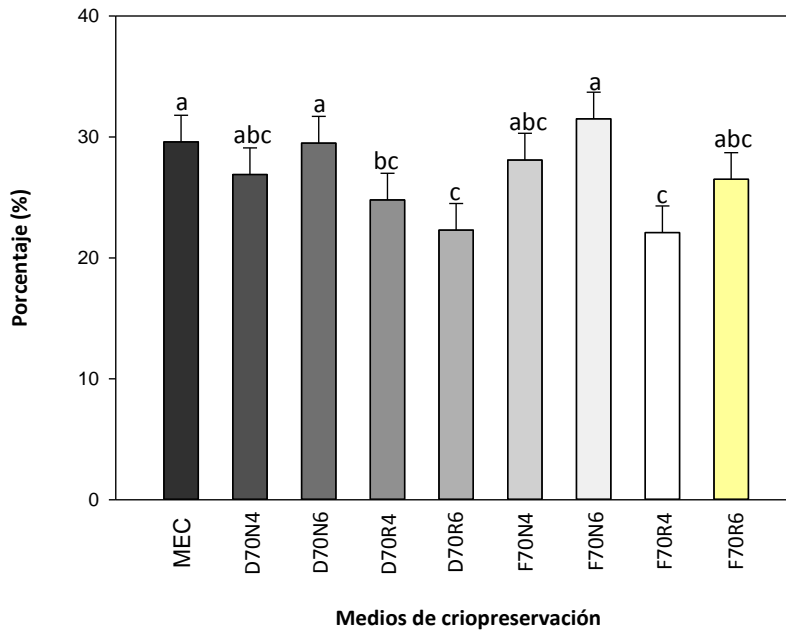


Figura 13. Porcentaje de viabilidad post-descongelación en función del medio de criopreservación. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar). Barras con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

4.1.3. Efecto de los medios de criopreservación sobre los parámetros cinéticos del esperma post-descongelación.

No se observaron diferencias significativas sobre el porcentaje de motilidad post-descongelación entre los medios (figura 14). Alcanzándose un nivel medio de motilidad de $31.1 \pm 0.79 \mu\text{m/s}$. El coeficiente de la covariable (motilidad del esperma en fresco) fue de 0.68 ± 0.125 .

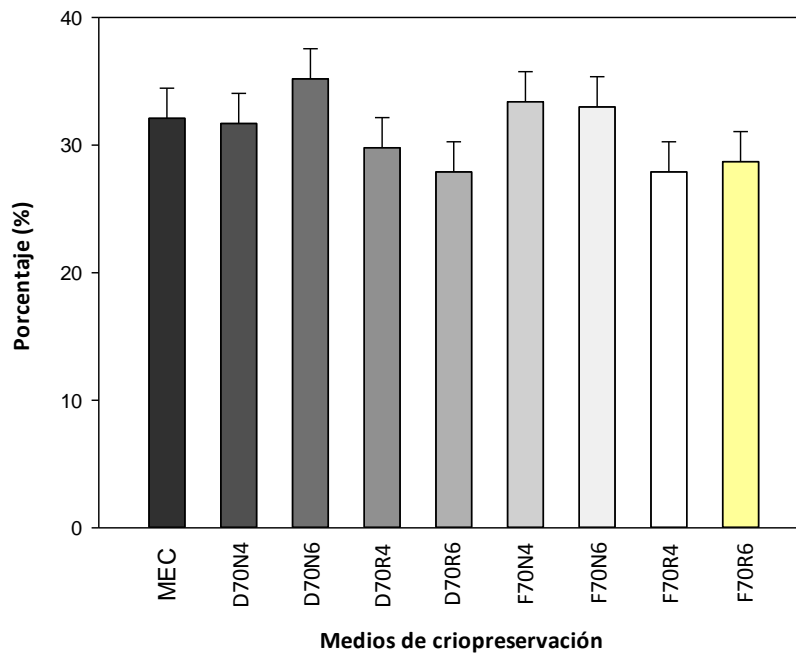


Figura 14. Porcentaje de motilidad post-descongelación en función del medio de criopreservación. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar).

En cuanto a los parámetros cinéticos que describen la trayectoria de los espermatozoides (VCL, VAP, LIN y ALH) no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los medios ensayados (figura 15), siendo los valores medios obtenidos: $89.9 \pm 1.41 \mu\text{m/s}$; $47.8 \pm 0.68 \mu\text{m/s}$; 31.4 ± 0.312 ; $3.16 \pm 0.04 \mu\text{m}$ para VCL, VAP, LIN y ALH respectivamente. La presencia de dextrano o ficoll en la composición de los medios o la reducción de la sacarosa no tuvo efecto sobre la motilidad (figura 14) ni sobre los parámetros que la describen (figura 15). Los coeficientes de las covariables (VCL, VAP, LIN y ALH en el espermatozoides fresco) fueron 1.41 ± 0.148 ; 0.97 ± 0.111 ; 0.40 ± 0.055 ; 0.95 ± 0.209 (respectivamente).

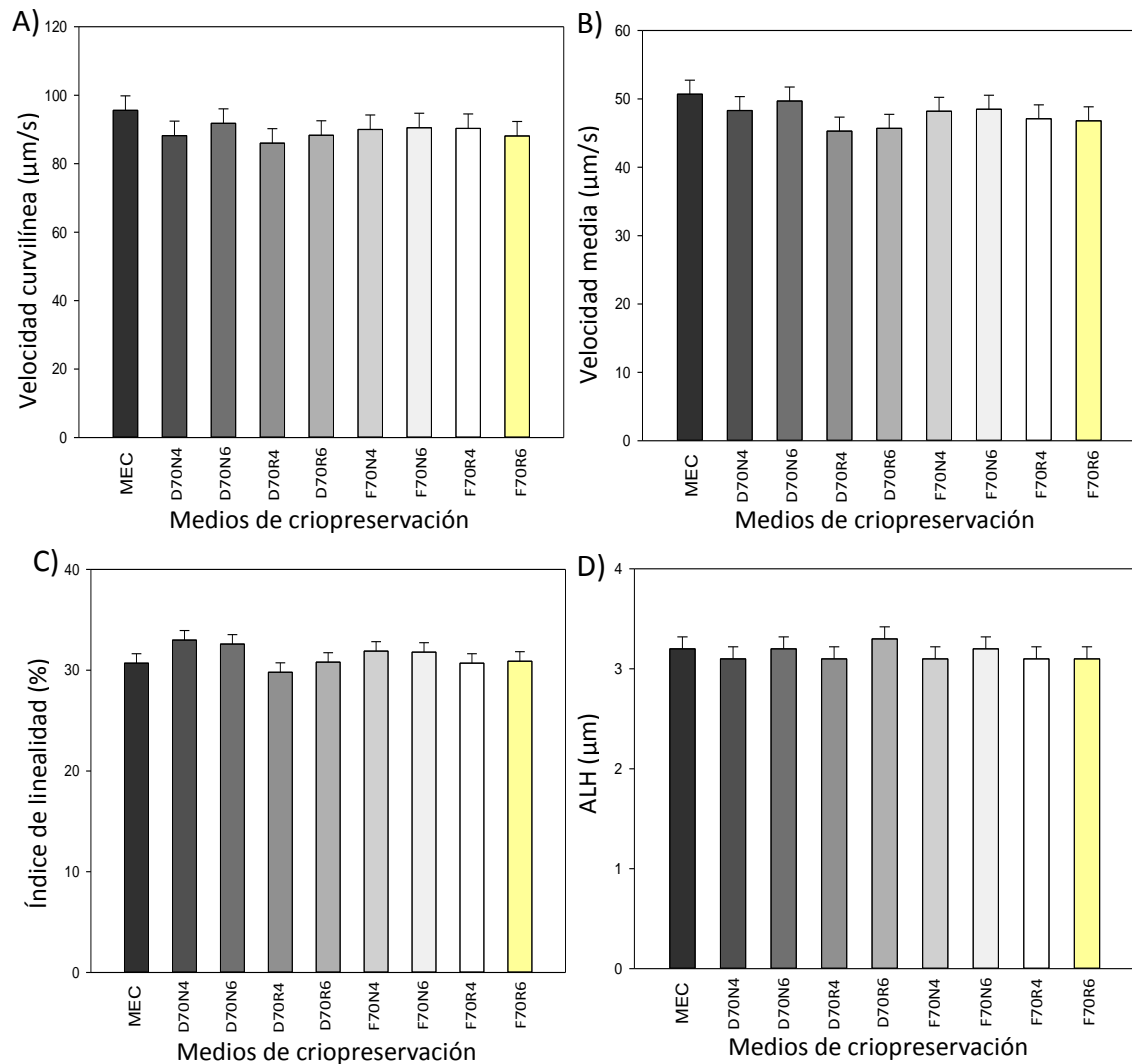


Figura 15. Valores de los parámetros cinéticos de los espermatozoides post-descongelación en función del medio de criopreservación (VCL, VAP, LIN y ALH; gráficas A, B, C y D respectivamente). Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar).

4.2. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.

Para estudiar el efecto del protocolo de congelación (caja de congelación frente a congelador programable) y el del polímero dextrano en el medio de criopreservación (D70N6 frente a MEC) los 4 grupos experimentales fueron testados *in vitro* e *in vivo*, tomando como referencia un quinto grupo, el control de semen no congelado (fresco).

4.2.1. Parámetros seminales post-descongelación.

La viabilidad (integridad de la membrana plasmática) post-descongelación resultó ser igual para los distintos grupos experimentales ($P > 0.05$; figura 16).

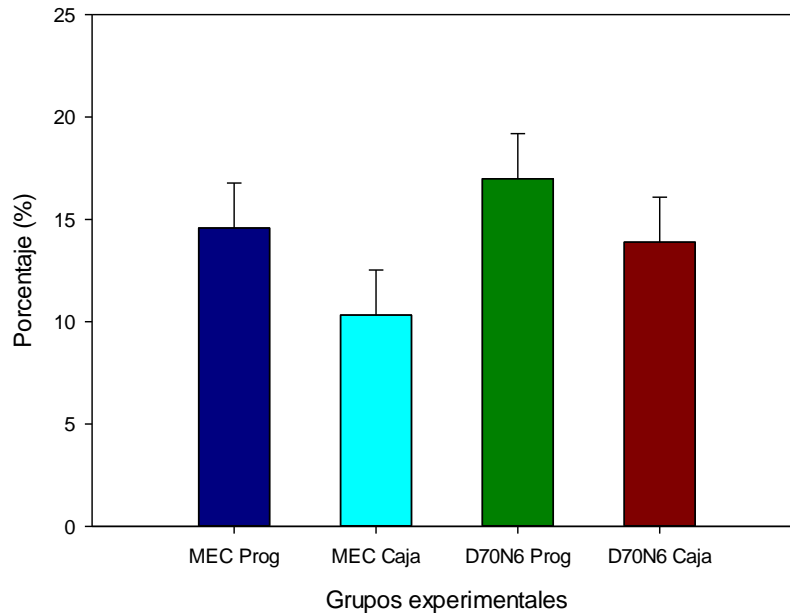


Figura 16. Porcentaje de espermatozoides viables post-descongelación en función del grupo experimental. Valores de $ls \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar).

El valor medio post-descongelación obtenido para la viabilidad fue de 13.9 ± 1.12 % de espermatozoides vivos.

La integridad de la membrana acrosomal post-descongelación tampoco mostró diferencias entre los grupos experimentales ($P > 0.05$; figura 17). El valor medio post-descongelación obtenido para este parámetro fue 17.8 ± 1.14 % de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto.

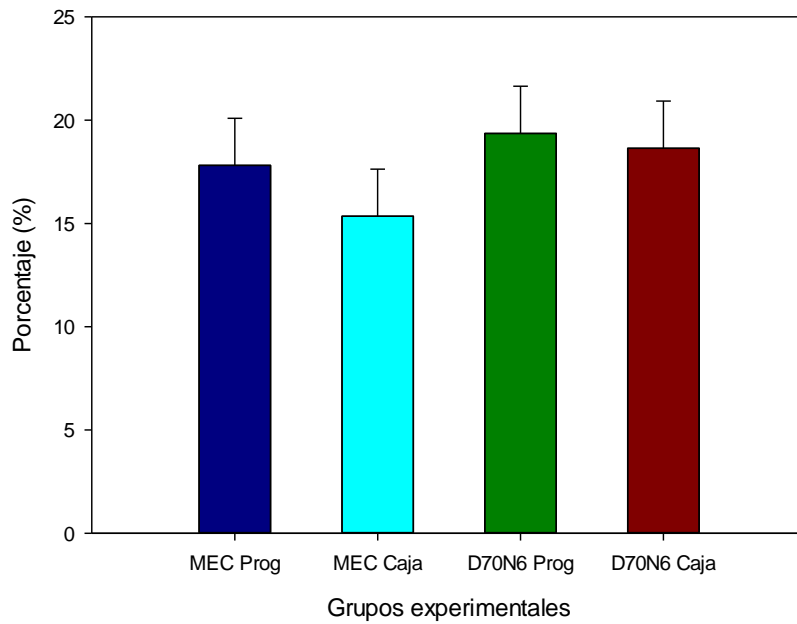


Figura 17. Porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto post-descongelación en función del grupo experimental. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar).

El último parámetro evaluado *in vitro* fue la motilidad del esperma post-descongelación y, al igual que los parámetros anteriores, tampoco mostró diferencias entre los grupos experimentales ($P > 0.05$; figura 18). El valor medio post-descongelación obtenido para la motilidad fue $21.9 \pm 1.24 \mu\text{m/s}$.

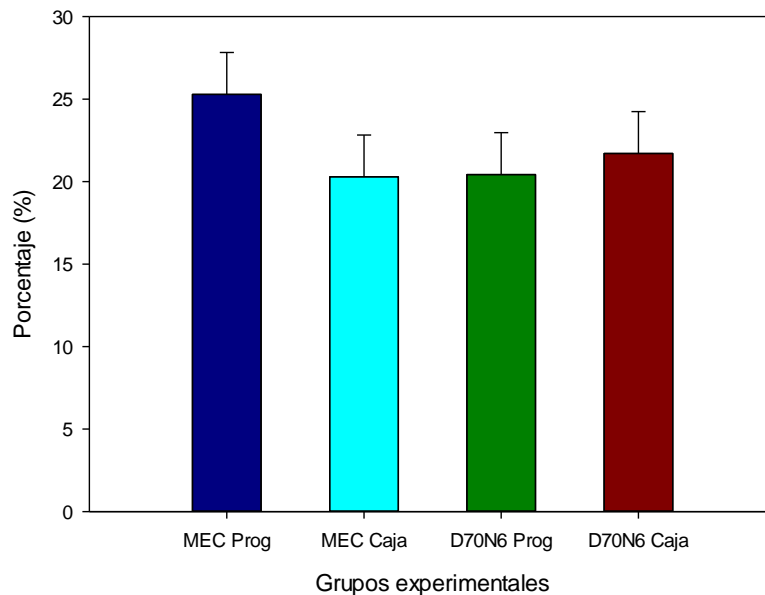


Figura 18. Porcentaje de motilidad post-descongelación en función del grupo experimental. Valores de $lsm \pm es$ (medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar).

4.2.2. Fertilidad al parto y prolificidad.

Las inseminaciones que se llevaron a cabo y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Datos de las inseminaciones y sus resultados para cada uno de los 5 grupos de trabajo que forman el experimento 2.

Grupo experimental	Nº de inseminaciones	Nº de partos	Tasa de fertilidad al parto (lsm ± es)	Prolificidad (lsm ± es)
Control fresco	46	37	0.80 ± 0.058 ^a	8.8 ± 0.58 ^a
MEC Prog	55	37	0.67 ± 0.063 ^{ab}	6.4 ± 0.58 ^b
MEC Caja	49	24	0.49 ± 0.071 ^b	7.1 ± 0.72 ^{ab}
D70N6 Prog	53	30	0.57 ± 0.068 ^b	6.6 ± 0.64 ^b
D70N6 Caja	53	32	0.60 ± 0.067 ^b	6.4 ± 0.62 ^b

MEC (medio estándar de congelación); D70N6 (Dextrano al 6% peso/volumen y sacarosa 0,1M); Prog (congelador programable); caja (caja de congelación); lsm ± es (medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar). Medias con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

El medio que contiene dextrano junto con cualquiera de los protocolos de congelación estudiados mostró una tasa de fertilidad al parto inferior al control (57-60% frente al 80% respectivamente). Lo mismo ocurre para el MEC con la caja de congelación. Tan sólo el MEC con el congelador programable obtuvo un resultado similar al control, aunque no diferente al resto de los grupos experimentales ensayados (tabla 4).

Igual que ocurría con la fertilidad, el medio con dextrano, independientemente del protocolo utilizado, mostró una prolificidad inferior a la obtenida por el medio control. Lo mismo sucede para el medio estándar con el sistema de congelación programable. En cambio, el grupo experimental formado por el medio estándar y el protocolo de congelación en caja obtuvo valores de prolificidad similares al control fresco (tabla 4).

5. Discusión

5.1. Experimento 1. Efecto de los medios de criopreservación *in vitro* sobre los parámetros seminales post-descongelación.

La inclusión en el medio de congelación de los polímeros ficoll y dextrano, con un peso molecular en torno a 70 kDa, no ha mejorado los parámetros espermáticos estudiados *in vitro*. No obstante, se ha observado que los medios con mayor concentración de sacarosa preservan mejor tanto la membrana plasmática como la acrosomal. Como se mostraba en las figuras 12 y 13, los medios MEC, D70N6 y F70N6 han conseguido preservar mejor ambas membranas. Estos medios tienen en común una concentración de sacarosa de 0,1M mientras que los medios que han obtenido resultados significativamente inferiores tienen una concentración de sacarosa de 0,05M. Estos resultados coinciden con lo observado por Vicente y Viudes-de-Castro (1996) que evaluaron estas dos concentraciones con diversos disacáridos, además de sacarosa, con la finalidad de sustituir un componente habitual de los medios de congelación de esperma, la yema de huevo, que ayuda a preservar la estabilidad e integridad de las membranas celulares. Los disacáridos como la sacarosa, son pues crioprotectores no permeables que ejercen su función deshidratando parcialmente a las células y dificultando por tanto la formación de hielo intracelular y, además, parecen interactuar con la membrana estabilizándola (Mocé y Vicente, 2009; Swain y Smith, 2010; Rosato y Iaffaldano, 2013).

Por otra parte, el efecto de los polímeros en el medio de criopreservación no ha resultado significativo a ninguna de las dos concentraciones testadas para ninguno de los parámetros evaluados, aunque si hemos podido observar que su incorporación no contribuye a elevar la osmolaridad de los medios, los cuales presentan una elevada osmolaridad principalmente por la contribución a ésta del DMSO. Los espermatozoides suelen tolerar los medios hiperosmolares pero no el descenso posterior a osmolaridades fisiológicas, típico de los procedimientos de congelación, radicando aquí los problemas más importantes para lograr preservar la fertilidad de los espermatozoides post-descongelación. El hecho de que dos de los medios (D70N6 y F70N6) que mejores resultados han mostrado contengan en su composición un polisacárido (ficoll o dextrano), pese a que no han logrado mejorar significativamente los resultados obtenidos con el MEC *in vitro*, permite plantear medios para futuros ensayos con polímeros de estos compuestos a mayores concentraciones o con polímeros de diferente peso molecular. Además, siguiendo esta perspectiva, probablemente pueda reducirse la concentración de DMSO, manteniendo o incrementando ligeramente la concentración de sacarosa.

A pesar que el dextrano es una sustancia habitual en estudios de criopreservación de tejidos, células e incluso embriones animales, tan sólo ha sido evaluado en semen por Kundu *et al.* (2002). Estos autores evaluaron el efecto del dextrano, solo o en combinación con glicerol y DMSO, sobre el esperma de caprino, observando que la motilidad post-descongelación cuando solo se incluía el dextrano como crioprotector se reducía hasta el 10-25% frente a un 40% cuando el medio combinaba dextrano y glicerol o DMSO. Además, estos mismos autores y otros determinaron que el efecto crioprotector del dextrano depende de la masa molecular del polímero, siendo la más favorable 10kDa (Schmehl *et al.*, 1986; Kundu *et al.*, 2002). Los futuros estudios podrían ir dirigidos a evaluar *in vivo* el efecto que tiene en el medio de criopreservación el polímero dextrano con este peso molecular.

El efecto del ficoll (70kDa; 2% peso/volumen) como crioprotector en el medio de congelación de semen conejo ha sido estudiado recientemente por Kulikova *et al.* (2014). Estos autores observaron un efecto favorable en la motilidad (+15%) frente a un medio control similar al utilizado en este estudio. Por contra, el ficoll no contribuyó a la conservación de las membranas espermáticas post-descongelación. En el presente estudio el ficoll en una proporción similar o ligeramente superior en el medio final de congelación (2 y 3%) no aportó ventaja alguna sobre la motilidad ni sobre la conservación de las membranas.

Los resultados obtenidos *in vitro* no permitieron seleccionar un medio como el mejor ni garantizan el éxito de ninguno de ellos en el estudio *in vivo*. En cambio, estos resultados sí que nos permiten descartar algunos de los medios para no aplicarlos en la parte experimental *in vivo* puesto que el hecho de que algunos medios conserven mejor determinados atributos del esperma necesarios para la fecundación del ovocito aumenta las probabilidades de éxito de los mismos en el estudio *in vivo* (Colenbrander *et al.*, 2003; Graham, 1996; Amann, 2005). Los medios descartados pues, fueron aquellos que presentaban una menor concentración de sacarosa (0,05M). De los 5 medios restantes se tuvo que seleccionar únicamente 2 para la parte experimental *in vivo* debido a que el número de conejas disponibles para ser inseminadas era un factor limitante y, atendiendo a la variabilidad de los caracteres a evaluar *in vivo* (fertilidad al parto y prolificidad), son necesarias al menos 50 inseminaciones por grupo experimental para poder observar diferencias en torno al 15% de fertilidad y de más de un conejo nacido (gazapo). Además, en el segundo experimento se evaluaron dos protocolos de criopreservación que diferían en el control de la velocidad de descenso de la temperatura.

5.2. Experimento 2. Efecto del medio y del protocolo de criopreservación sobre la fertilidad al parto y la prolificidad.

Puesto que el objetivo del estudio era determinar el efecto de la presencia de un polisacárido en el medio de congelación se seleccionó el medio D70N6 (medio con dextrano y no estudiado en semen de conejo) y se comparó con un medio habitual de congelación de semen de conejo (MEC). Los espermatozoides expuestos a estos medios fueron congelados siguiendo dos protocolos que diferían en la velocidad de congelación, pudiendo así evaluar el efecto combinado velocidad y medio. Además, dados los resultados del primer experimento, la concentración de sacarosa escogida fue la más elevada, por lo que ambos medios eran idénticos para este factor y únicamente diferían en la presencia del polisacárido.

Las pruebas *in vitro* realizadas en esta segunda fase del estudio con los grupos experimentales, constituidos a partir de los dos medios escogidos y los dos protocolos de congelación, no mostraron diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los parámetros seminales evaluados (figuras 16, 17 y 18). Esto coincide con los resultados obtenidos en la primera fase experimental donde tampoco se observaron diferencias entre estos medios para ninguno de los parámetros evaluados.

Los resultados obtenidos *in vivo* en esta fase del estudio muestran que los grupos experimentales formados por el medio con dextrano, tanto en el protocolo de congelación en caja de polietileno expandido como en el del congelador programable, no mejoran los resultados de fertilidad y prolificidad de ninguno de los grupos que contienen el MEC. Además los grupos experimentales que incluyen dextrano en el medio han sido significativamente inferiores al control fresco. Tan solo el medio MEC con el protocolo de congelación programable presentó una tasa de fertilidad al parto similar a la del control fresco y este mismo medio con el protocolo de congelación en caja obtuvo valores de prolificidad que se asemejan a los del esperma fresco. De lo que se deduce que la combinación medio y protocolo de congelación influye sobre los resultados de fertilidad y prolificidad, de acuerdo con los resultados de Mocé *et al.* (2015).

Recientemente, tan solo Kulikova *et al.* (2014) han estudiado el efecto *in vivo* de la adición de polisacáridos como el ficoll al medio de congelación. Los resultados obtenidos, tanto para la tasa de fertilidad al parto como para la prolificidad, fueron superiores a los obtenidos en este estudio (75 % frente a 60% y 7.5 frente a 6.5 respectivamente). En este caso sí que se observó un efecto positivo del polímero (ficoll) y se logró alcanzar los niveles, tanto de tasa de fertilidad al parto como de prolificidad, obtenidos por el control fresco. Dado que los resultados obtenidos *in vitro* para el ficoll son similares a los del dextrano y, que existe una baja correlación con las evaluaciones *in vitro* de los parámetros post-decongelación, será necesario evaluar mediante inseminación este medio y, a la vista de nuestros resultados, combinarlo con los dos protocolos de congelación. Además debe tenerse en cuenta que tanto la viabilidad espermática post-decongelación, como la fertilidad y la prolificidad pueden estar determinadas por la estirpe genética de machos donantes y de conejas inseminadas, por su estado fisiológico e incluso por la estación en la que se realiza el ensayo. Debido a ello siempre resulta difícil establecer comparaciones para estos resultados.

Los resultados obtenidos han demostrado que, en ningún caso se han observado tasas de fertilidad y prolificidad que sean suficientemente competitivas con las inseminaciones con semen fresco. Debido a esto, todavía no puede establecerse un sistema de almacenamiento eficaz para el esperma de conejo que permita cubrir las necesidades de producción quedando solo cubiertas las necesidades de preservación desde el punto de vista de la conservación de recursos genéticos (biodiversidad).

6. Conclusión

En base a los resultados obtenidos, puede concluirse que la adición de ficoll o dextrano (pm 70.000) a niveles del 4 y 6% a un medio con DMSO y sacarosa no mejora los resultados *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, en el caso del semen congelado, los parámetros estudiados *in vitro* no reflejan la capacidad fecundante *in vivo* del mismo. Finalmente, indicar que la combinación medio y protocolo de congelación utilizado puede afectar a los resultados de prolificidad y fertilidad *in vivo*.

7. Bibliografía

- AMANN, R.P. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J Androl.*, 10: 89–98.
- AMANN, R.P. (2005). Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species. *Theriogenology*, 63: 698–715.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl.*, 14: 397–406.
- AN, T.Z.; IWAKIRI, M.; EDASHIGE, K.; SAKURAI, T.; KASAI, M. (2000). Factors affecting survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40: 237–249.
- ANDRABI, S.M.H. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 44: 552–569.
- ANSAH, G.A.; BUCKLAND, R.B. (1982). Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid levels and the relationships of these lipids with fertility of frozen-thawed and fresh semen. *Poult Sci.*, 61: 623-637.
- ASHWOOD-SMITH, M.J.; WARBY, C.; CONNOR, K.W.; BECKER, S. (1971). Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinyl pyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology*, 8: 453–464.
- CASARES-CRESPO, L.; VICENTE, J.S. TALAVÁN, A.M.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2016). Does the inclusion of protease inhibitors in the insemination extender affect rabbit reproductive performance? *Theriogenology*, 85: 928–932.
- CASTELLINI, C.; CARDINALI, R.; DAL BOSCO, A.; MINELLI, A.; CAMICI, O. (2006). Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology*, 65: 703–712.
- CHEN, Y.; FOOTE, R. H. (1994). Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim. Reprod. Sci.*, 35: 131–143.
- CHEN, G.; YUE, A.; RUAN, Z.; YIN, Y.; WANG, R.; REN, Y.; ZHU, L. (2016). Comparison of the Effects of Different Cryoprotectants on Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells International*, IN PRESS. DOI: 10.1155/2016/1396783
- COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Domest Anim.*, 38: 305–311.
- CRITSER, J.K.; RUSSELL, R.J. (2000). Genome Resource Banking of Laboratory Animal Models. *ILAR Journal.*, 41: 183-186.
- CURRY, M.R.; KLEINHANS, F.W.; WATSON, P.F. (2000). Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 41: 167-173.
- CURRY, M.R.; REDDING, B.J.; WATSON, P.F. (1995). Determination of water permeability coefficient and its energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32: 175–181.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. (1997). Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology*, 48: 831–841.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. (1997). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14: 466–470.
- DUMOULIN, J.C.; JANSSEN, J.M.B.; PIETERS, M.H.; ENGINSU, M.E.; GERAEDT, J.P.; EVERS, J.L. (1994). The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil. Steril.*, 62: 793–798.

- EMMENS, C.W.; BLACKSHAW, A.W. (1950). The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa. *Austral. Vet. J.*, 26: 226–228.
- FOX, R.R.; BURDICK, J.F. (1963). Preservation of rabbit spermatozoa: ethylene glycol vs. glycerol for frozen semen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113: 853–856.
- GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. (1980). Problems with laboratory assays, en: *Proceedings, 8th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. pp 59–66. National Association of Animal Breeders, Columbia, Missouri.
- GRAHAM, J.K. (1996). Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 12: 119–29.
- GRAHAM, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci.*, 68: 239–47.
- GRAHAM, J.K.; MOCE, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64: 492–504.
- HOLT, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47–58.
- IAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; PINA ROSATO, M. (2012). The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology*, 78: 1381–1389.
- KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, S.E.; MIYAKE, T.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. (1992). High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol. Reprod.*, 46: 1042–1046.
- KULESHOWA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43: 21–31.
- KULIKOVA, B.; DI IORIO, M.; KUBOVICOVA, E.; KUZELOVA, L.; IAFFALDANO, N.; CHRENEK, P. (2014). The cryoprotective effect of Ficoll on the rabbit spermatozoa quality. *Zygote*, 23: 785–794.
- KUNDU, C. N.; CHAKRABARTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. (2002). Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*, 123: 907–913.
- 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: 1130–1141.
- LEIBO, S.P.; SONGSASEN, N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303–326.
- LIU, E.; KITAJIMA, S.; WIESE, E.; REIFENBERG, K.; MORIMOTO, M.; WATANABE, T.; FAN, J. (2007). Re-establishment of complement C6-deficient rabbit colony by cryopreserved sperm transported from abroad. *Exp. Anim.*, 56: 167–171.
- LOPEZ-GATIUS, F.; SANCES, G.; SANCHO, M.; YANIZ, J.; SANTOLARIA, P.; GUTIERREZ, R.; NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J.; SOLER, C. (2005). Effect of solid storage at 15 °C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 64: 252–260.
- MAKAREVICH, A.V.; CHRENEK, P.; OLEXIKOVA, L.; POPELKOVA, M.; TURANOVA, Z.; OSTRO, A.; PIVKO, J. (2008). Post-thaw survival, cell death and actin cytoskeleton in gene-microinjected rabbit embryos after vitrification. *Theriogenology*, 70: 675–681.

- MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TALAVÁN, 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: 846–851.
- MOCÉ, E.; LAVARA, R.; VICENTE, J.S. (2003a). Effect of an asynchrony between ovulation and insemination on the results obtained after insemination with fresh or frozen sperm in rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, 75: 107–118.
- 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. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 1–7.
- 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. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42: 189-196.
- MOCÉ, E.; VICENTE, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110: 1-24.
- MOCÉ, E.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R. (2003b). Effect of freezing–thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60: 115–123.
- NALESNIK, J.G.; SABANEKH, E.S.; ENG, T.Y.; BUCHHOLZ, T.A. (2004). Fertility in men after treatment for stage1 and 2A seminoma. *American Journal of Clinical Oncology*, 27: 584-588.
- PAPIS, K.; SYPECKA, J.; KORWIN-KOSSAKOWSKI, M.; WENTA- MUCHALSKA, E.; BILSKA, B. (2005). Banking of embryos of mutated, paralytic tremor rabbits by means of vitrification. *Lab. Anim.*, 39: 284–289.
- PARRISH, J.J.; FOOTE, R.H. (1986). Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol. Reprod.*, 35: 253–257.
- PELLERIN-MENDAS M.L.; MARCHAND-ARVIER M.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. (1997). In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of red blood in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 35: 173–186.
- PEÑA, F.J. (2015). Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Anim. Reprod.*, 12: 351-355.
- PETRUNKINA, A. M.; WABERSKI, D.; BOLLWEIN, H.; SIEME, H. (2010). Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology.*, 73: 995–1000.
- PETRUNKINA, A.M.; HARRISON, R.A.P. (2010). Systematic mis-estimation of cell populations by flow cytometry: a mathematical analysis. *Theriogenology*, 73: 839–847.
- QUAN, G.B.; HAN, Y.; LIU, M.X.; FANG, L.; DU, W.; REN, S.P.; WANG, J.X.; WANG, Y. (2011). Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. *Cryobiology*, 62: 135-144.
- ROCA, J.; MARTINEZ, S.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS, X.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.*, 64: 103–112.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BARTH, A.D. (2007). In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 64: 39–54.
- ROSATO, M.P.; IAFFALDANO, N. (2011). Effect of Chilling Temperature on the Long-Term Survival of Rabbit Spermatozoa held either in a Tris-Based or in a Jellified Extender. *Reprod. Dom. Anim.*, 46: 301–308.

- 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: 508–516.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.*, 62: 77–111.
- SAWADA, Y.; CHANG, M.C. (1964). Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril.*, 15: 222–229.
- SCHMEHL, M.K.; VAZQUEZ, I.A.; GRAHAM, E.F. (1986). The effect of nonpenetrating cryoprotectant added to TEST–yolk glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23: 512–517.
- SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E.P.C. (2015). Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, 84: 1447–1454.
- SHAW, J.M.; KULESHOWA, L.L.; MACFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O. (1997). Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35: 219–229.
- SMITH, A.U.; POLGE, C. (1950). Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, 166: 668–669.
- SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. 2. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology*, 35: 255-269.
- SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H.; ANDREW, J.B.; POWEL, R.L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.*, 44: 375–381.
- SWAIN, J.E.; SMITH, G.D. (2010). Cryoprotectants, en: *Fertility Cryopreservation*. Ed. Cambridge University Press. UK: 24–38.
- THIBIER, M.; GUERIN, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.*, 62: 233–251.
- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. (1997). Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod.*, 56: 991-998.
- THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability cryopreservation. *Biol Reprod.*, 66: 545- 554.
- THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.*, 22: 382-394.
- THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. (2002). Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *CryoLetters*, 23: 255-262.
- VICENTE, J.S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (1996). A sucrose–DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod Nutr Dev.*, 36: 485–492.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; MOCÉ, E.; LAVARA, R.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J.S. (2014). Aminopeptidase activity in seminal plasma and effect of dilution rate on rabbit reproductive performance after insemination with an extender supplemented with buserelin acetate. *Theriogenology*, 81: 1223–1228.

- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S. (1996). A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Anim. Reprod. Sci.*, 44: 195-201.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R. (1999). Effet du nombre de spermatozoides sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin. *Ann. Zootech.*, 48: 407–412.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; CORTELL, C.; VICENTE, J.S. (2010). Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology*, 74: 1623-1628.
- WALTERS, E.M.; BENSON, J.D.; WOODS, E.J.; CRITSER, J.K. (2009). The History of Sperm Cryopreservation, en: *A Practical Guide to Sperm Banking*. Ed. Cambridge University Press. UK: 112-118.
- WANG, X.; XU, H. (2010). Incorporation of DMSO and dextran-40 into a gelatin/alginate hydrogel for controlled assembled cell cryopreservation. *Cryobiology*, 61: 345-351.