

Paula Domingo Tomás

Preservación espermática en la especie cunícola. Estudio de nuevas tecnologías

Departamento
Patología Animal

Director/es
González Orti, Noelia
Gil Huerta, Lydia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**PRESERVACIÓN ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE
CUNÍCOLA. ESTUDIO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS**

Autor

Paula Domingo Tomás

Director/es

González Orti, Noelia
Gil Huerta, Lydia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2019



**Preservación espermática en la
especie cunícola.**

Estudio de nuevas tecnologías

**Sperm preservation in rabbits.
Research of new technologies**

Paula Domingo Tomás

2018





Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



**PRESERVACIÓN ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE
CUNÍCOLA. ESTUDIO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS**

**SPERM PRESERVATION IN RABBITS. RESEARCH
OF NEW TECHNOLOGIES**

Paula Domingo Tomás

2018





Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Dra. Lydia Gil Huerta, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza, y Dra. Noelia González Ortí, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN que:

Dña. Paula Domingo Tomás, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección durante los años comprendidos entre 2015 y 2018 los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada **“Preservación espermática en la especie cunícola. Estudio de nuevas tecnologías”**, la cual coincide con el proyecto de Tesis aprobado por la comisión de Doctorado.

Así mismo, certificamos que el material bibliográfico, experiencias y casuística presentados han sido seleccionados y que tanto su elaboración como sus resultados y conclusiones hacen estimar al que suscribe, como directora y co-directora de la Tesis Doctoral, que cumple los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su defensa de “Doctor con mención Internacional”, pudiendo ser sometida al tribunal que sea nombrado por la Dirección del Departamento.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos este informe en Zaragoza a 21 de Septiembre de 2018.

Fdo.: Lydia Gil Huerta

Fdo.: Noelia González Ortí

Tesis Doctoral

PRESERVACIÓN SEMINAL EN LA ESPECIE CUNÍCOLA. ESTUDIO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Paula Domingo Tomás.

TESIS DOCTORAL POR COMPEDIO DE PUBLICACIONES

Publicaciones en revistas.

Domingo P, Gil L. (2016) Preservación seminal: estado actual en la especie cunícola. *Boletín de cunicultura*, 180, 30-35.

Publicaciones en revistas incluidas en Journal of Citation Reports (JCR).

Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. (2018) Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents. *Cryobiology*, 81, 174-177. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.01.004.

Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. (2018) Effects of seminal plasma and different cryoprotectants on rabbit sperm preservation at 16°C. *Exp Anim*, 67(4). doi: 10.1538/expanim.17-0152

Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. (2018) Comparison of different semen extenders and cryoprotectant agents to enhance the cryopreservation of rabbit spermatozoa. *Czech J Anim Sci*.

Artículo científico derivado de esta tesis doctoral en proceso de revisión.

Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. (2018) Effect of glycerol, n, n-dimethylformamide and n-methyl-2-pyrrolidone on rabbit sperm stored at 4°C and 16°C. *Anim Reprod*.

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Zaragoza (UZ 2017-BIO-03), el Fondo Social Europeo y el Gobierno de Aragón a través de la dotación económica al Grupo de Referencia RAYSA (A17_17R)

A mis padres

A mi hermana

"La idea era hacer investigación,
buscar nuevos caminos a conquistar,
nuevas montañas que escalar"

Gertrude Belle Elion (1918-1999)
Premio Nobel de Fisiología y Medicina

AGRADECIMIENTOS

Hace diez años, cumplí uno de mis grandes sueños, un sueño que llevaba anhelando desde que tengo uso de razón, estudiar veterinaria. En ese entonces empecé mi andadura y tras cinco maravillosos años ya podía decirlo, soy veterinaria. Pronto me di cuenta que mi pasión era la investigación; indagar y razonar, descubrir y analizar. Y lo que no sabía en ese entonces que mi vida me encaminaría para estar aquí y ahora, escribiendo una tesis doctoral y alcanzando el máximo grado académico al que puedo optar.

Así que, no podría empezar de otra manera que agradeciendo a la Dra. Lydia Gil por haberme dado la oportunidad de formar parte de su familia “reproductora” y cumplir otro de mis sueños, realizar una tesis doctoral. Gracias Lydia por haberme encaminado, cuidado y haber confiado en mí.

También quiero agradecer a mi co-directora la Dra. Noelia González, por haber formado parte de esta difícil andadura, que al final hemos conseguido juntas.

A mis amigos del departamento de Reproducción Animal, por todo el cariño y apoyo que me han dado durante todos estos años. Me quedo con las innumerables charlas con mi querida Dra. Felisa Martínez y todos los cafés compartidos con el Dr. Antonio del Niño Jesús. También me quedo la simpatía del Dr. José Ignacio Martí, la Dra. María Victoria Falceto y mi compañera de despacho la Dra. Olga Mitjana. Y por supuesto, con mis queridísimas amigas la Dra. Victoria Luño y Dra. Maite Olaciregui. Vicky, gracias por haberme escuchado y ayudado en todo momento, ha sido un gran placer coincidir contigo amiga. Maite, mi compi, la que ha estado mano a mano conmigo desde el primer momento, no puedo estar más agradecida de haberte conocido, sé que me llevo una gran amiga para toda la vida.

Quiero agradecer al Dr. Ignacio de Blas por haberme ayudado en todo momento, desde haberme animado a realizar una tesis doctoral a ayudarme con toda la estadística de la misma.

No puedo olvidarme de las maravillosas vivencias y oportunidades que me ha brindado esta tesis doctoral. La primera, la estancia de investigación que realicé en una preciosa ciudad medieval italiana, Perugia. De la cual conservo bonitos recuerdos y amistades.

Gracias Margherita y Linda por haberme introducido en la fantástico mundo de la biología molecular, y Carolina, Elisa y sobre todo a Carleen, por vuestra amistad. La segunda, la estancia de investigación realizada en la paradisíaca isla de Hawái, Oahu. Además de haber tenido la oportunidad de vivir en el paraíso, tuve la oportunidad de conocer y enriquecerme con sus valores y modo de vida. Conocí la pasión que tienen por la investigación y la bondad de cada uno de ellos. Gracias al Dr. Steven Ward y todo el equipo de IBR por acogerme, a la Dra. Hieu Nguyen por enseñarme desde diseñar un plásmido hasta hacer inmunocitoquímica, y a mis queridos compañeros de laboratorio Austin y Thien. Mil gracias a Jon, Chantell, Ariel, Quincy y Mayumi por su amistad, por hacerme sentir como en casa, por haber organizado mil planes y enseñado los lugares más maravillosos de la isla.

Quiero dar las gracias a mis sis, por todo el apoyo que me han dado, por hacerme feliz y animarme en los momentos no tan buenos, por las fiestas sorpresas y los viajes, pero sobre todo por no ser simplemente amigas, por ser mi familia. A Sandra, la más detallista, por todo tu cariño y que a pesar de estar muy lejos siempre te siento muy cerca. A Laura, la más chistosa, por las innumerables locuras que hemos hecho juntas. A Claudía, la más pequeña, por tu alegría y felicidad.

No podría acabar los agradecimientos de otra manera que dando las gracias a las personas más importantes de mi vida, las que siempre me apoyan y están a mi lado, las que me hacen ser la persona más feliz del mundo y de las que estaré eternamente agradecida por tenerlas en mi vida. Mi padre, mi ejemplo a seguir, gracias por inculcarme que con esfuerzo, trabajo y dedicación todo, tarde o temprano, se consigue. Gracias por haberme transmitido el amor por los animales y ayudarme día a día con tu experiencia. Gracias por las conversaciones y discusiones sobre patología, veterinaria o incluso cualquier tema interesante. Mi madre, mi incondicional, gracias por haberme inculcado tus valores, hoy en día soy quien soy gracias a ti. Gracias por transmitirme tu afán de querer aprender y progresar. Gracias por estar en cualquier momento sin importar nada ni nadie más. Mi hermana, mi todo, gracias por ser mi mejor amiga, mi compañera de vida, mi cómplice. Gracias por saber que necesito en cada momento, por conocerme como nadie me conoce. Gracias por todos tus consejos, por alegrarme los días, por ser la persona que mejor me complementa. Y por supuesto no podría olvidarme de mis abuelos, mi abuela Lucía, porque aún sin entender muy bien que es esto del doctorado me pregunta cada día cómo lo llevo y me da ánimos y fuerza. Gracias por todos sus valiosos consejos y reflexiones

sobre la vida. Gracias por pensar siempre en nosotras, tus tres nietas y querernos por encima de todo. Y los que siguen mis pasos desde el cielo, Juanjo, Miguel y Pilar, porque sé que estaríais orgullosos de mí.

¡Gracias Familia, este largo camino no habría sido posible sin vosotros!

ÍNDICE

Introducción	1
Revisión bibliográfica: Artículo 1.....	11
Objetivos.....	19
Material y Métodos	23
Diseño experimental y resultados	35
Artículos.....	45
Artículo 2	47
Artículo 3	57
Artículo 4	77
Artículo 5	95
Conclusiones.....	101
Conclusions.....	105
Resumen.....	109
Summary	115
Bibliografía	121
Apéndice	133

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Composición de los diluyentes de refrigeración	25
Tabla 2. Composición de los diluyentes de congelación	26
Tabla 3. Composición de los diluyentes de liofilización	26
Figura 1. Tubos colectores con semen recién extraído	26
Figura 2. Protocolo de congelación	
Figura 2a. Unidad de congelación y rejilla con pajuelas de congelación.....	28
Figura 2b. Tanque de nitrógeno líquido con pajuelas de congelación	28
Figura 3. Protocolo de liofilización	
Figura 3a. Crioviales congelados	29
Figura 3b. Liofilizador programable	29
Figura 4. Test de vitalidad espermática	
Figura 4a. Espermatozoide sin teñir	30
Figura 4b. Espermatozoide teñido.....	30
Figura 5. Test de integridad de la membrana plasmática	
Figura 5a. Espermatozoide con cola en espiral	31
Figura 5b. Espermatozoide con cola recta.....	31
Figura 6. Test de integridad del ADN espermático	
Figura 6a. Espermatozoide con ADN intacto.....	32
Figura 6b. Espermatozoide con ADN fragmentado	32

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza

ATP: Adenosina trifosfato

BCF: Frecuencia de batido

CP: Crioprotector

DMF: N, N-Dimetilformamida

EDTA: Ácido etilen-1,2-diamino 2,2',2'',2'''-tetraacético

EGTA: Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético

FIO: Factor inductor de la ovulación

FIV: Fecundación *in vitro*

GLM: Modelo lineal general

HOS test: Test hipoosmótico

IA: Inseminación artificial

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

LH: Hormona luteinizante

LIN: Índice de linealidad de la trayectoria curvilínea

LN₂: Nitrógeno líquido

MOT: Motilidad total

NMP: N-Metil-2-Pirrolidona

PBS: Tampón fosfato salino

PS: Plasma seminal

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCDt: Test de dispersión de la cromatina del espermatozoide

STR: Índice de rectitud

TE: Transferencia de embriones

VAP: Velocidad media

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

WOB: Índice de oscilación

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida en mamíferos han evolucionado notablemente a lo largo de los años con el fin de preservar razas en peligro de extinción y mejorar la producción animal. Un gran salto en la mejora de la reproducción animal fue gracias a la inseminación artificial (IA), la cual empezó a utilizarse en cunicultura desde 1920 (Sinkovicks y cols., 1983). Sin embargo, en las explotaciones cunícolas españolas no fue instaurada hasta finales de los años 80 (López y Alvariño, 2000; Lavara y cols., 2003; Hernández y cols., 2012). Este gran avance fue posible debido a que la fertilidad obtenida mediante IA, tanto a partir de semen fresco como de semen refrigerado, se asemejaba a la obtenida mediante monta natural (80% de fertilidad) (Hernández y cols., 2012). Actualmente la IA es una práctica muy común que aporta notables ventajas y conlleva un aumento de la eficiencia económica de las explotaciones: permite disminuir el número de machos reproductores en la granja, puesto que con el eyaculado de un macho es posible inseminar entre 30-35 hembras; es posible valorar la calidad seminal y controlar la transmisión de enfermedades; nos posibilita reagrupar hembras en el mismo estadio del ciclo y por lo tanto sincronizar partos; ofrece la ventaja de distribuir semen incluso entre largas distancias; y además seleccionar buenos machos reproductores lo que nos da opción a mejorar la genética de la raza y preservar recursos genéticos (Alvariño, 1993; López y Alvariño, 1998).

Otras técnicas de reproducción asistida como la fecundación *in vitro* (FIV), la transferencia de embriones (TE) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) son actualmente muy utilizadas en medicina humana, gracias al desarrollo y puesta a punto de las mismas utilizando modelos animales. El conejo es considerado uno de los mejores modelos animales de laboratorio debido a la gran similitud que presentan sus espermatozoides con los espermatozoides humanos. Además son animales de fácil manejo, en los que resulta sencillo obtener muestras seminales (a diferencia del ratón no es necesario sacrificar al animal), se pueden obtener resultados más rápidos (períodos cortos de gestación) y existe la posibilidad de adaptar el mismo a experimento en otras especies. Cabe destacar que la primera TE tiene sus orígenes en 1890, cuando Walter Heape transfirió con éxito embriones de una coneja a otra naciendo seis gazapos completamente sanos (Biggers, 1991). En 1929, Lewis y Gregory publicaron el primer

experimento de FIV el cual se había realizado en la especie cunícola. Lewis y Gregory lograron madurar embriones *in vitro* hasta el estadio de blastocisto y, a pesar de no obtener descendencia viva tras transferirlos a las trompas de Falopio de una coneja, este estudio sirvió de modelo para otras especies animales. No fue hasta 1934 cuando Pincus y Enzmann obtuvieron el primer nacimiento de un conejo procedente de la técnica FIV.

Por ello, el desarrollo de estas biotecnologías hace necesario implementar métodos más eficaces para la preservación de material genético, sistemas que permitan el almacenamiento durante largos períodos de tiempo manteniendo la viabilidad de los espermatozoides y que garanticen también su transporte entre largas distancias. La refrigeración, la congelación y la liofilización son los tres métodos utilizados para la preservación seminal.

La **refrigeración** es la principal técnica utilizada en las explotaciones cunícolas de cría intensiva. A pesar de ello, es una técnica que solo permite almacenar espermatozoides a temperaturas entre 4 y 25°C durante 48 horas, tras ese período de tiempo la fertilidad se ve considerablemente afectada (López y Alvariño, 1998; Roca y cols., 2000; Johnke y cols., 2014). Por ello, resultaría de gran interés la investigación de nuevos diluyentes que permitan almacenar semen durante períodos de tiempo más largos y también optimizar del proceso de refrigeración.

La supervivencia espermática se ve afectada tanto por la temperatura de almacenamiento como por la composición del diluyente (Carluccio y cols., 2004). Para cumplir con las necesidades de los espermatozoides, la mayoría de los diluyentes de refrigeración están compuestos a base de una solución tampón y suplementos. La solución tampón está compuesta por citrato de sodio, acetato potásico y/o bicarbonato sódico que son los encargados de aportar los minerales necesarios para garantizar un pH en torno a 7 y un adecuado equilibrio iónico. Los suplementos son muy variados y podemos encontrar diferentes opciones: sustancias coloidales que protegen los espermatozoides evitando su aglutinación y precipitación, como puede ser el ácido etilen-1,2-diamino 2,2',2'',2'''-tetraacético (EDTA); sustancias nutritivas que favorezcan el metabolismo, vida y longevidad del espermatozoide como lo son la glucosa y los antioxidantes; y sustancias bactericidas como la gentamicina, penicilina, enrofloxacin y/o estreptomycin que evitan la proliferación de bacterias (Alvariño, 1993). Debido a la gran cantidad de combinaciones posibles, han sido muchos los diluyentes (López y Alvariño, 2000;

Carluccio y cols., 2004) y sustancias (Trejo y cols., 2013; Johnke y cols., 2014; Sariözkan y cols., 2014) estudiadas para preservar el semen durante el máximo tiempo posible. Sin embargo, Carluccio y cols. (2004) demostraron que INRA 96[®] mantenía la calidad del semen de conejo mejor que otros diluyentes a pesar de ser un diluyente específico para refrigerar semen de caballo.

En la actualidad, la **congelación** o **criopreservación** es el único método capaz de preservar espermatozoides durante períodos indefinidos de tiempo (Gibb y Aitken, 2016). La primera congelación espermática data de 1776, cuando Lazaro Spallanzani observó que espermatozoides de humanos, caballos y ranas quedaban inmovilizados cuando entraban en contacto con nieve y se reactivaban cuando eran sometidos de nuevo a altas temperaturas. En 1937, Bernstein y Petropavlovsky congelaron espermatozoides de conejo, cobaya, morueco, toro, cerdo, caballo y aves utilizando una solución con glicerol, que permitió alcanzar temperaturas de congelación de -21°C. No obstante, no fue hasta 1949 cuando Polge y cols. introdujeron el glicerol como crioprotector (CP), suponiendo un gran avance en el desarrollo de los sistemas de congelación celular.

Hoy en día, la criopreservación seminal se emplea con éxito en la especie bovina gracias a las elevadas tasas de supervivencia espermática tras la descongelación (Carluccio y cols., 2004), sin embargo en la especie cunícola no se ha desarrollado ningún procedimiento ni ningún diluyente efectivo que pueda evitar el daño que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación, por lo que en cunicultura este método no es utilizado con fines comerciales (López y Alvarino, 1998; Maeda y cols., 2012). Esto es debido a que son muchos los factores que influyen durante el proceso de congelación-descongelación. Nos encontramos con factores internos o propios del animal (especie animal, conformación del espermatozoide, permeabilidad de la membrana, hidratación, etc) y con factores externos los cuales podemos modificar para evitar el daño celular (composición química del diluyente, temperatura de congelación, velocidad de congelación y descongelación, plasma seminal (PS), etc).

La congelación aporta el beneficio de que permite preservar semen durante más tiempo, mediante la reducción de la tasa metabólica de los espermatozoides disminuyendo el gasto de ATP y la motilidad espermática, también reduciendo la producción de metabolitos tóxicos procedentes de la glucólisis y la fosforilación oxidativa que acidifican el medio (peróxido de hidrógeno, aldehídos o dióxido de cloro) y reduce las especies

reactivas de oxígeno (ROS) (Hammerstedt, 1993; Gibb y Aitken, 2016). Sin embargo, durante el proceso de congelación-descongelación, en los espermatozoides de los mamíferos, se forman cristales de hielo intracelulares que causan destrucción celular y daño en la membrana, el citoesqueleto, el acrosoma, el ADN y el flagelo (Fuller y Paynter 2004; Hernández y cols., 2012), lo que conlleva a una bajada de la tasa de fertilidad de al menos un 20% (Castellini y cols., 2006). Para evitar este grave daño irreversible, es necesario mejorar los protocolos de crioconservación.

Una manera de mejorar los protocolos de congelación de semen es mediante la investigación de nuevos agentes CP. El glicerol es el principal CP utilizado para la criopreservación de espermatozoides tanto en animales domésticos como salvajes (Curry y cols., 1995), a pesar de ello no es el primer CP de elección a la hora de congelar espermatozoides de conejo debido a la toxicidad que presenta en esta especie. Otros autores han demostrado previamente en conejos que el glicerol puede provocar estrés osmótico y desnaturalización de proteínas (Alvariño 1993; Gilmore y cols., 1995; Iaffaldano y cols., 2012) debido a su alto peso molecular, el cual hace que atraviese la membrana celular más lentamente que otros CP y ocasione estrés oxidativo en la membrana (Gilmore y cols., 1995). Por ello, dadas las características de los espermatozoides de conejo (alta energía de activación y bajo coeficiente de permeabilidad de agua), los CP con menor peso molecular y mayor permeabilidad, como las amidas o los grupos metilos, podrían ser los más adecuados para reducir el daño osmótico (Darinbennet y White, 1977; Curry y cols., 1995; Mocé y Vicente, 2009). La N, N-dimetilformamida (DMF) es un disolvente amida que podría utilizarse como CP en la congelación de espermatozoides. Hasta la fecha no hay estudios sobre la eficacia que podría tener la DMF para congelar semen de conejo, pero sí que los hay en otras especies. Por ejemplo, estudios previos demostraron que la DMF es mejor CP que el glicerol cuando es utilizada para congelar espermatozoides de caballos (Olaciregui y cols., 2014; Pukazhenthí y cols., 2014). Por el contrario, se ha demostrado que en jabalí (Malo y cols., 2009), perro (Futino y cols., 2008; Lopes y cols., 2009; Mota Filho y cols., 2011), cabra (Bezerra y cols., 2011) y aves (Chalah y cols., 1999) la calidad de los espermatozoides empeora cuando se usa DMF en lugar de glicerol. Otro disolvente amida utilizado comúnmente en reacciones químicas es N-metil-2-pirrolidona (NMP). Pero a diferencia de la DMF, no hay estudios previos de congelación seminal en ninguna especie utilizando este CP.

Otro factor a tener en cuenta para mejorar el protocolo de congelación de semen de conejo podría ser el efecto que ejerce el PS. El PS es la fracción líquida del semen que interviene en la supervivencia y competencia espermática, el desarrollo embrionario, la receptividad endometrial y la función ovárica de las hembras después de la IA (Holtz y Foote, 1978; Alvariño, 2000; Troedsson y cols., 2005; Waberski y cols., 2006). El PS está compuesto por fructosa, sorbitol, ácido cítrico, inositol, glicerol, ergotioneína, ácido glutámico, electrolitos, glicerilfosforilcolina, proteínas como el factor inductor de la ovulación (FIO) (Silva y cols., 2011), glicoproteínas, enzimas y minerales como sodio, potasio, fósforo, magnesio, calcio y zinc (Holtz y Foote, 1978; Setchell, 1989). Cada componente del PS tiene un rol diferente; FIO es una de las principales proteínas que estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH), la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo en especies con ovulación inducida o espontánea (Adam y Rato, 2013). Además, el FIO aumenta el número total de folículos antrales y folículos anovulatorios hemorrágicos en conejos (Silva y cols., 2011). Por el contrario, el PS presenta una glicoproteína que inhibe reversiblemente el proceso de capacitación espermática y la reacción acrosómica (Eng y Oliphant, 1979). Sin embargo los resultados en conejos no son muy concluyentes, la presencia de PS ha mostrado un ligero efecto beneficioso sobre la calidad del espermatozoide (Gogol, 1999; Castellini y cols., 2000; Aksoy y cols., 2008). Al igual que con el diluyente, el efecto del PS parece estar relacionado con la especie animal. En bovino (Sahni y Mohan, 1990; Graham, 1994), ovino (Graham, 1994) y equino (Aurich y cols., 1996; Moore y cols., 2005) se ha demostrado un efecto nocivo del PS durante el proceso de la congelación y descongelación de semen. Por el contrario, Sahni y Mohan (1990) y Martínez-Pastor y cols. (2006) demostraron que era mejor mantener el PS durante el proceso de congelación de espermatozoides de búfalo y ciervo respectivamente.

Por último, la tercera técnica utilizada para conservar semen es la **liofilización**, un proceso de conservación por el cual un sustrato congelado se somete a un primer secado por sublimación y posteriormente un segundo secado por desorción para conseguir la reducción del solvente y así, reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termosensibles de una sustancia (Jennings, 2002). Los orígenes de la liofilización se remontan al año 200 a.C. cuando los incas fabricaban chuño (papa liofilizada) y charqui (carne de llama), posteriormente fueron los vikingos quienes la utilizaron para conservar arenque de pescado. Más adelante, en 1935, Flosdorf y Mudd mejoraron la técnica consiguiendo liofilizar tejidos animales, plasma sanguíneo y fármacos. Pero no fue hasta 4 años más

tarde cuando se intentó conservar células vivas (bacterias, virus y hongos) mediante deshidratación (Flosdorf y Kimball, 1939). Desde entonces la liofilización ha sido considerada un método óptimo para preservar fármacos y alimentos (Ramirez y Cañizares, 2003), por ello en los últimos años los científicos han centrado su atención en adaptar esta técnica para preservar semen de mamíferos. En 1949, Polge y cols. llevaron a cabo los primeros intentos de liofilización de semen en aves y fue poco después cuando se intentó liofilizar semen de humano (Sherman, 1954) y de bovino (Bialy y Smith, 1957), sin obtener en ninguna de estas experiencias semen viable. El éxito fue obtenido por Wakayama y Yanagimachi (1998) cuando consiguieron la primera cría viva nacida a partir de semen liofilizado de ratón. Desde entonces se demostró que, a pesar de que los espermatozoides pierden su movilidad, sufren alteraciones en su morfología y daños moleculares durante el proceso de la liofilización; su ADN puede mantenerse íntegro y ser capaz de activar al ovocito dando lugar al desarrollo embrionario. Para que esto suceda los espermatozoides deben ser microinyectados en el ovocito mediante ICSI, aun así la tasa de fertilidad se ve seriamente comprometida por lo que su uso se restringe exclusivamente a nivel experimental. Hasta el momento, el único estudio publicado sobre la posibilidad de obtener descendencia a partir de espermatozoides liofilizados de conejo es de Liu y cols. (2004). En esta experiencia se transfirieron 230 embriones obtenidos mediante ICSI a 8 conejas de las cuales una quedó gestante y parió a los 33 días un feto formado y normal pero muerto a causa de una distocia a la hora del parto. En otras especies también se ha conseguido obtener descendencia viva, como en ratones (Wakayama y Yanagimachi, 1998; Kusakabe y cols., 2001; Ward y cols., 2003; Kaneko y Nakagata, 2006; Kusakabe y cols., 2008; Kaneko y Serikawa, 2012), ratas (Hirabayashi y cols., 2005; Hochi y cols., 2008) y caballos (Choi y cols., 2011). Por el contrario, en perros (Watanabe y cols., 2009; Olaciregui y cols., 2015), primates (Sanchez-Partida y cols., 2008), gatos (Ringleb y cols., 2011), cerdos (Men y cols., 2013; García Campos y cols., 2014) y toros (Martins y cols., 2007; Hara y col, 2011) no se ha obtenido descendencia viva.

Pese a que es la técnica más complicada, la liofilización posee grandes ventajas. A diferencia de la criopreservación, una vez liofilizado el semen, no es necesario almacenarlo a bajas temperaturas ni se requiere nitrógeno líquido (LN₂), por lo que se reducen enormemente los costes de almacenamiento, mantenimiento y transporte de las dosis seminales. Gracias a esta técnica, espermatozoides liofilizados de conejo han

podido ser almacenados durante 2 años a 4°C (Lui y cols., 2004; Keskinetepe y Eroglu, 2015).

Sin embargo, son muchos los estudios que deben llevarse a cabo para poder perfeccionar el procedimiento de liofilizar y rehidratar espermatozoides. Durante la liofilización-rehidratación, el ADN espermático puede dañarse debido al estrés mecánico y oxidativo al que está sometido (Kusakabe y cols., 2001; Kusakabe y cols., 2008). Esto es debido a que los cationes divalentes de Ca^{2+} y Mg^{2+} activan las endonucleasas de las membranas plasmáticas de los espermatozoides induciendo procesos de estrés oxidativo por la liberación de ROS, dañando el ADN y dando lugar a aberraciones cromosómicas (Kusakabe y cols., 2001; Sotolongo y cols., 2005). Estudios previos han demostrado que agentes quelantes como el EDTA o el ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) añadidos al medio de liofilización se combinan con los cationes divalentes formando complejos estables y por lo tanto son capaces de evitar la fragmentación del ADN de los espermatozoides (Kusakabe y cols., 2001; Kaneko y Nakagata, 2006; Kusakabe y cols., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que compuestos de origen vegetal, como el ácido rosmarínico (Pereira y cols., 2005), son capaces de neutralizar los ROS evitando el estrés oxidativo en cultivos celulares (Kusakabe y cols., 2001; Kusakabe y cols., 2008). Recientemente se ha comprobado que la incorporación de ácido rosmarínico en medios de congelación (Malo y cols., 2009; Zhang y cols., 2012; Luño y cols., 2014) y de liofilización (Olaciregui y cols., 2017) también proporciona protección a los espermatozoides frente al estrés oxidativo y mejora la calidad de la preservación de los espermatozoides.

Al igual que con las otras técnicas, la temperatura y el tiempo de almacenamiento son dos factores que deben tenerse en cuenta. Un gran avance sería poder almacenar semen durante largos períodos de tiempo y transportarlo a temperatura ambiente, sin embargo los estudios realizados hasta el momento han llegado a la conclusión que la temperatura óptima de almacenamiento son 4°C (Wakayama y Yanagimachi, 1998; Kaneko y Nakagata, 2005; Hochi y cols., 2008; Olaciregui y cols., 2015). Por otro lado, Kaneko y Nakagata (2005) han demostrado que espermatozoides liofilizados de ratón pueden ser almacenados durante 3 meses a temperatura ambiente y además, años más tarde, Kaneko (2014) también demostró que se podía obtener crías vivas a partir de semen de ratón liofilizado que había sido transportando a temperatura ambiente entre Japón y Estados Unidos.

Hoy en día, las técnicas de reproducción en cunicultura no están tan avanzadas como en otras especies debido a la baja tasa de fertilidad obtenida con semen congelado o liofilizado. Por ello consideramos muy importante estudiar el campo de la reproducción en la especie cunícola, con el fin de conseguir mantener el semen refrigerado durante más tiempo y poder facilitar su transporte, mejorar el protocolo de congelación seminal para poder utilizarse de forma rutinaria a nivel comercial y finalmente mejorar la técnica de liofilización para preservar material genético de razas en peligro de extinción.

Artículo 1: Revisión bibliográfica

“Preservación seminal: estado actual en la especie
cunícola”

(*Boletín de cunicultura*. 180, 30-35, 2016)

GENÉTICA

Preservación seminal: estado actual en la especie cunícola

El presente artículo tiene como objetivo la revisión del estado actual de los procesos de preservación de semen de conejo tanto a nivel de campo como de investigación, abarcando desde el proceso de extracción hasta la conservación de semen en diferentes condiciones (semen fresco, refrigerado, congelado y liofilizado).

PAULA DOMINGO TOMÁS Y LYDIA GIL HUERTA*

La inseminación artificial (IA) es una práctica común en las explotaciones cunícolas españolas, la cual se instauró a finales de los años 80 para la producción de carne de conejo (López y Alvariño, 2000; Lavara *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2012). Este gran salto se produjo gracias a que la fertilidad obtenida mediante IA, a partir tanto de semen fresco como de semen refrigerado, se asimilaba a la obtenida mediante monta natural (80%) (Hernández *et al.*, 2012).

*Departamento de Reproducción Animal, Universidad de Zaragoza, España

La IA aportó notables ventajas tales como la disminución del número de machos en la granja debido a la capacidad de un macho de cubrir entre 30 y 35 hembras por eyaculado, la valoración de la calidad del semen y el control de enfermedades, la reagrupación de las hembras en el mismo estadio del ciclo y sincronización de partos, la creación de centros de testaje, la distribución de semen, la selección de machos y la mejora genética de la raza, lo que conlleva a un aumento

en la eficiencia económica (Alvariño, 1993; López y Alvariño, 1998).

Una vez obtenido un eyaculado, su procesado puede variar en función de su aplicación. A nivel de granja se puede utilizar tanto semen fresco como semen refrigerado, mientras que a nivel experimental se están investigando otros métodos como la congelación y la liofilización.

Antes de procesar el semen para preservarlo deben seguirse unos pasos comunes a todas

TABLA 1. Principales parámetros de semen puro de conejo.

Parámetros	Primer eyaculado	Segundo eyaculado
Volumen en ml (sin gel) ²	0,86 ± 0,05	0,55 ± 0,05
Densidad ¹	Denso, cremoso	Menos denso
Color ¹	Blanco nacarado	Más claro
pH ²	7,49 ± 0,05	7,37 ± 0,07
Espermatozoides por ml (millones) ²	421 ± 43,5	736 ± 43,5
Motilidad de espermatozoides (%) ²	60,0 ± 2,8	77,8 ± 2,8

¹Alvariño, 2000; ²Fallas-López et al., 2011

las técnicas. Primero debe recuperarse el semen mediante una vagina artificial y un tubo colector (**Foto 1**). La temperatura del agua que se encuentra entre la camisa y el cuerpo de la vagina debe estar en torno a los 50-55°C (Lavara et al., 2003; Carluccio et al., 2004) con el fin de que la camisa de la vagina artificial alcance, al menos, los 42°C en el momento de la recogida, asemejándose así a la temperatura de la vagina de la coneja. Si la temperatura es inferior a 42°C el macho tendrá dificultad para saltar mientras que si la temperatura es superior a los 50°C corremos el riesgo de que el macho se orine e incluso podría ocasionarle lesiones en el pene (Alvariño, 1993).

El ritmo de recuperación idóneo sería de 2 ó 3 veces por semana y macho, distanciadas en el tiempo al menos 30 minutos cuando se realice en el mismo día (El-Tarabany et al., 2015). Como se observa en la **Tabla 1**, el volumen de los eyaculados oscila entre 0,3 y 1 ml y la concentración va de 150 a 700 x10⁶ espermatozoides por ml, siendo susceptibles a variaciones (Rosell, 2000).

Recuperado el eyaculado, deberemos retirar la fase gelatinosa o tapón mucoso en aquellos eyaculados donde

esté presente evitando de este modo que se aglutinen los espermatozoides y pierdan la movilidad (Fallas-López et al., 2011). Posteriormente se realiza una valoración macroscópica (volumen, densidad, color, pH) del semen y una primera valoración microscópica (motilidad, porcentaje de espermatozoides móviles, trayectorias rectilíneas del espermatozoide, espermatozoides anómalos y presencia de aglutinaciones, cuerpos extraños o células descamativas) de cada eyaculado para poder desestimar los de peor calidad (Alvariño, 1993; Lavara et al., 2003; Carluccio et al., 2004) (**Tabla 1**). Una vez valorado, se diluye en proporción 1:5 antes de 10 minutos postrecogida, siendo la temperatura del diluyente alrededor de 37°C para evitar que se produzca un shock térmico (Lavara et al., 2003). Finalmente los eyaculados de buena calidad son mezclados para obtener una mezcla heterospérmica (pool) (Carluccio et al., 2004). En líneas de investigación no siempre se hacen muestras heterospérmicas, pues hay ocasiones en las que es interesante tener constancia de a qué macho pertenece el eyaculado. La dilución favorece la supervivencia de los espermatozoides y permite

A nivel de granja se puede utilizar tanto semen fresco como semen refrigerado, mientras que a nivel experimental se están investigando otros métodos como la congelación y la liofilización

aumentar el volumen total de masa espermática de este modo a partir de un solo eyaculado se inseminan un elevado número de hembras (Alvariño, 2000; Lavara et al., 2003).

El color varía cuando existe una patología, puede ser de color amarillo (orina en el eyaculado), rojizo (sangre fresca), marrón (elementos sanguíneos degenerados), blanquecino-transparente (baja concentración espermática) o muy opaco (degeneraciones testiculares) (Alvariño, 1993).

Por último, es necesario hacer un recuento de espermatozoides/ml con cámaras de recuento celular (cámara de Neubauer, Bürker, Thoma) con el fin de diluir la muestra hasta



Foto 1.
Colectores con semen recién extraído

ajustar la concentración de espermatozoides deseada. Cada dosis deberá tener una concentración de 10 a 20 millones de espermatozoides (Lavara *et al.*, 2003) para cubrir las exigencias mínimas para la fecundación (entre 1-6 millones de espermatozoides móviles por dosis) (Alvariño, 1993). En el caso de inseminar a partir de monodosis es necesario dispensar el pool en cánulas (puede realizarse manualmente o con envasadora automática) (**Foto 2**).

Hay diferentes tipos de cánulas y de diferentes materiales (**Foto 3**). Las primeras cánulas que se utilizaron para la IA en conejos con semen fresco o refrigerado eran de vidrio pero presentaban riesgo de rotura o perforación del genital de la coneja en el momento de la aplicación, por ello se empezaron a buscar alternativas como las cánulas de plástico. Hay cánulas de plástico rígido y de plástico flexible de un solo uso. Las de plástico rígido (puede ser acodada o no) están preparadas para ser aplicadas por una pistola de inseminación y las dosis están preparadas en pool. Por otro lado,

las cánulas de plástico flexible ya vienen cargadas de semen (monodosis). Algunos autores recomiendan que las cánulas deben impregnarse de vaselina para facilitar su aplicación (Mora, 2014).

Debemos tener en cuenta que para tener éxito con la IA previamente hay que inducir la ovulación a la coneja, ya que la coneja no presenta un ciclo estral regular sino que la ovulación es inducida por el macho si la coneja está receptiva. Puede favorecerse la receptividad o el estro de la coneja mediante un tratamiento con una hormona foliculo estimulante como la PMSG (eCG), 20-25 UI a las 48-72 horas antes de la IA (Theau-Clément, 2007), provocando así la maduración de una nueva oleada folicular, un aumento de los estrógenos y el comportamiento de celo (vulva roja). También puede favorecerse la salida del estro con bioestímulos (Flushing alimenticio y luminoso, lactancia controlada). Finalmente, para reforzar la respuesta ovulatoria, se administra GnRH o un análogo en el mismo momento de la IA (Alvariño, 1993; Rosell, 2000).



Foto 2.
Envasadora automática de semen en cánulas monodosis

Semen fresco

El semen fresco no presenta ningún tratamiento térmico, los espermatozoides se mantienen a temperatura ambiente, y es aconsejable realizar la IA en las 4 primeras horas tras su obtención (Rosato *et al.*, 2006). El protocolo descrito anteriormente es el que hay que seguir para preparar dosis a partir de semen fresco, pudiéndose emplear diluyentes específicos para refrigerar semen o diluyentes iónicos como el suero fisiológico o la solución salina tamponada de fosfato (Alvariño, 1993; Lavara *et al.*, 2003).

Semen refrigerado

La supervivencia de los espermatozoides se ve afectada tanto por la temperatura de almacenamiento como por la composición del diluyente (Carluccio *et al.*, 2004). De este modo, cuando el semen se mantiene a temperaturas de refrigeración entre 16 y 18°C debe utilizarse entre las 36 y 48 horas tras su recuperación, para evitar que la fertilidad disminuya considerablemente (López y Alvariño, 1998).

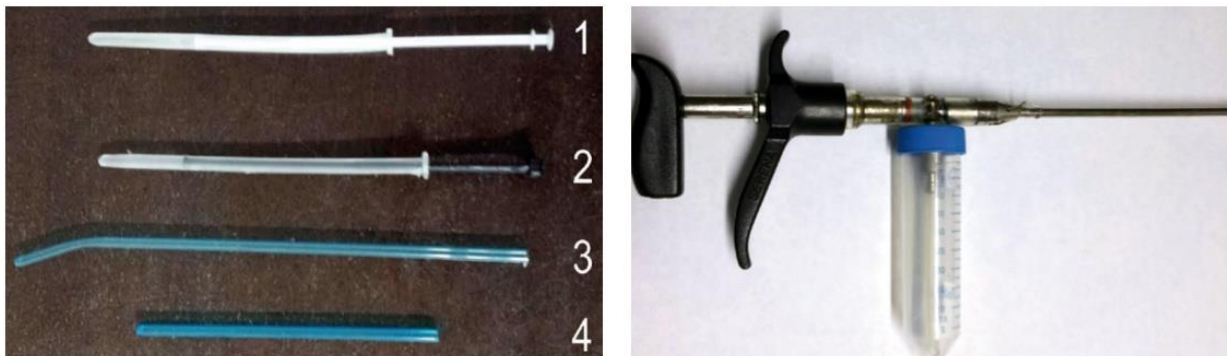


Foto 3. Cánulas monodosis, cánulas rígidas y pistola utilizada en la IA en conejos. *1 y 2 cánula flexible, 3 cánula rígida acotada, 4 cánula rígida recta.

En granjas de cría intensiva sería útil poder almacenar semen por períodos superiores a 48 horas, por ello actualmente se está investigando la formulación de diluyentes con nuevos componentes que permitan largos períodos de almacenamiento de semen y la optimización del proceso de refrigeración (Carluccio *et al.*, 2004).

Los diluyentes que presentan las siguientes características: presión osmótica isotónica (para no perder la motilidad

ni que aparezcan formas anómalas), sustancias tampón para mantener el pH en torno a 7, sustancias coloidales para proteger los espermatozoides, sustancias nutritivas que favorezcan el metabolismo, vida y longevidad del espermatozoide y estar libres de bacterias u organismos infecciosos (Alvariño, 1993).

La mayoría de los diluyentes están compuestos a base de una solución tampón y suplementos que ayudan a mantener los espermatozoides. La so-

lución tampón está compuesta por citrato de sodio, acetato potásico y/o bicarbonato sódico que son los encargados de aportar los minerales necesarios para garantizar un pH y equilibrio iónico adecuado. Los suplementos más utilizados son el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) (anticoagulante, evita la aglutinación y precipitación de los espermatozoides), glucosa (suplemento energético), antioxidantes (disminuyen el estrés oxidativo) y bactericidas (antibióticos como

la gentamicina, penicilina, enrofloxacina y/o estreptomina que evitan la proliferación de bacterias).

Los diluyentes sin hormona análoga a la GnRH que actualmente están en el mercado son Lepus[®] (MEDI Chimica, Reggio Emilia, Italia), M III[®] (MINITUB, Tiefnbach, Alemania), Galap[®] (IMV Technologies, L'Aigle, Francia), Cunigel[®] (IMV Technologies, L'Aigle, Francia), IA-873A[®] (INSERBO, Lleida, España). Por otro lado, el diluyente MRA-BIT[®] (KUBUS S.A., Madrid, España; compuesto por dextrosa, citrato sódico, acetato potásico y excipiente) evita tener que administrar de forma intramuscular la hormona GnRH o un análogo de la misma en el momento de la IA gracias a su composición.

López y Alvaríño en 1998, estudió la conservación de semen de conejo con diluyente MA24[®] (Laboratorios Ovejero, León, España) a 18°C durante 96 horas. En este estudio podemos observar que la fertilidad se mantiene en el 80% cuando el semen se aplica entre las 2 y las 48 horas tras su extracción. Tras pasar 48-72 horas la fertilidad desciende al 68% y cuando la IA se ha realizado después de 96 horas, la fertilidad no supera el 40%.

Semen congelado

En el proceso de congelación-descongelación se forman cristales de hielo intracelulares en los espermatozoides causando destrucción celular y daño de sus membranas entre ellas el acrosoma (Fuller y Painter, 2004; Hernández *et al.*, 2012), lo que conlleva una bajada de la tasa de fertilidad de, al menos, un 20% (Castellini *et al.*, 2006).

Mientras que el semen conge-

La liofilización se utiliza para preservar virus, bacterias, levaduras, hongos y actualmente también es utilizada para preservar espermatozoides, con el fin de facilitar el almacenamiento y el transporte

lado se ha empleado con éxito en la IA de otras especies como en el vacuno (Carluccio *et al.*, 2004), en la especie cunícola no se ha desarrollado ni un procedimiento ni se ha identificado un agente crioprotector (CPA) efectivo, por lo que en cunicultura no suele usarse a nivel comercial (López y Alvaríño, 1998; Maeda *et al.*, 2012). Los diluyentes compuestos a base de Tris (Tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico y fructosa o glucosa) son los utilizados frecuentemente para criopreservar el semen de conejo (Mocé y Vicente, 2009). Es frecuente encontrar yema de huevo en concentraciones de 10 y 20% en el compuesto de Tris (Fox, 1961) o leche desnatada con una concentración final entre el 8 y 10% (O'Shea y Wales, 1969). Mientras que en otros mamíferos el glicerol es el CPA de elección, en conejos no es el más adecuado (Iaffaldano *et al.*, 2012). Suelen utilizarse CPAs de menor peso molecular y mayor permeabilidad como amidas o grupos metilos (dimetilsulfóxido (DMSO), lactamida o acetamida) (Curry *et al.*, 1995; Mocé y Vicente, 2009).

En 1971 se desarrolló un diluyente por Stranzinger *et al.* que estaba formado por yema de huevo, glucosa, ácido cítrico, Tris, DMSO, glicerol, penicilina y estreptomina. Actualmente hay un diluyente comercial de congelación, CUNIFreeze[®] (IMV Technologies) que contiene 20,3% de yema de huevo y un CPA no especificado (Mocé y Vicente, 2009). Sin embargo, ni estos diluyentes ni los descritos en la bibliografía han demostrado ser suficientemente eficaces para la congelación de semen de conejo (Iaffaldano *et al.*, 2012).

Para congelar semen, el protocolo habitual consiste en la obtención del eyaculado y dilución entre 1:5 y 1:10 con diluyentes específicos para la criopreservación, seguidamente se procede al descenso gradual de la temperatura para evitar un shock térmico. Generalmente se desciende la temperatura hasta los 5°C en un período de 90 a 120 min (Mocé y Vicente, 2009). A continuación se almacena el semen diluido y refrigerado en pajuelas de plástico de 0,5 cc. (Alvaríño, 1993). Posteriormente, antes de ser sumergido en nitrógeno líquido para su almacenamiento, se congela el semen colocándolo durante 6-10 minutos entre 2 y 10 centímetros por encima del nivel de nitrógeno líquido (Alvaríño, 1993; Mocé y Vicente, 2009). Para realizar la descongelación, se coloca la pajuela durante 1 minuto en "baño maría" a 25°C ó 21 segundos a 37°C, según cada autor (Mocé y Vicente, 2009).

De todos modos, la utilización de semen congelado estaría limitada por un coste mayor (mayor tiempo y necesidad de equipamiento específico) que difícilmente será asumible y además una disminución de la fertilidad. No obstante, podría

utilizarse para la introducción de material genético para la producción de abuelas o hembras cruzadas.

Semen liofilizado

La liofilización se utiliza para preservar virus, bacterias, levaduras, hongos y actualmente también es utilizada para preservar espermatozoides de mamíferos, con el fin de facilitar el almacenamiento y el transporte (Day y Stacey, 2007).

Los espermatozoides, una vez se han liofilizado, son inmóviles e incapaces de fecundar, pero sí que son capaces de producir descendencia en vivo

cuando se realiza por ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides en ovocitos) (Kaneko *et al.*, 2003) y aun así la tasa fertilidad se ve seriamente comprometida. Por lo que su uso es exclusivamente experimental, ya que el conejo es utilizado como modelo para el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la biotecnología de la reproducción.

Para llevar a cabo el proceso de liofilización primero debe congelarse el semen. A continuación las muestras se someten al proceso de liofilización: se realiza un secado primario a una presión de 0,053 mbar a -68°C, un secado secundario a una presión de 0,018 mbar a

20°C y finalmente se almacena (Gil *et al.*, 2014; Olaciregui *et al.*, 2015).

El único estudio publicado sobre la posibilidad de obtener descendencia a partir de espermatozoides liofilizados es de Liu *et al.* en 2004. En esta experiencia se transfirieron 230 embriones obtenidos mediante ICSI a 8 conejas de las cuales una quedó gestante y parió a los 33 días un feto formado y normal pero muerto a causa de una distocia a la hora del parto. ♦

BIBLIOGRAFÍA

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: redaccion@editorialagricola.com

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis doctoral fue investigar los procesos de refrigeración, congelación y liofilización espermática en la especie cunícola. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Evaluar la influencia del PS y el efecto de diferentes CP (glicerol, DMF y NMP) sobre la calidad espermática durante el almacenamiento de las muestras seminales en condiciones de refrigeración (Artículo 2).
2. Valorar el efecto protector del glicerol, DMF y NMP en espermatozoides de conejo refrigerados a dos temperaturas (16°C y 4°C) durante un largo período de tiempo (Artículo 3).
3. Analizar el efecto de diferentes CP (glicerol, DMF y NMP) y del PS frente al posible shock térmico que pueden sufrir los espermatozoides durante el proceso de congelación. (Artículo 4).
4. Evaluar el efecto de dos agentes quelantes (EGTA y EDTA) y sustancias antioxidantes como el ácido rosmarínico sobre la integridad del ADN de espermatozoides liofilizados. Determinar la temperatura óptima de almacenamiento de espermatozoides liofilizados. (Artículo 5).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Animales

Todos los procedimientos experimentales de esta tesis doctoral se realizaron según lo establecido en el RD 1201/05 de la Ley de Protección animal, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 86/609 de protección de animales utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.

Las muestras seminales se obtuvieron de machos reproductores previamente seleccionados procedentes de un centro de IA (Técnicas Cunicolas S.A., Zaragoza, España). Los conejos fueron alojados en jaulas individuales con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura ambiente entre 22 y 24°C y una humedad relativa del 60-70%. Todos los conejos fueron alimentados con una dieta comercial de acuerdo con su condición reproductiva y se les suministró agua fresca *ad libitum*.

II. Medios

El medio utilizado para refrigerar las muestras de semen fue INRA 96[®] (IMV Technologies, L'Aigle, Francia), al que se le añadieron diferentes CP (Tabla 1). Para el proceso de congelación se utilizó BotuCrio[®] (Nidacon, Mölndal, Suecia) como diluyente control y un diluyente de refrigeración (INRA 96[®]) al que se le añadieron diferentes CP (Tabla 2). Finalmente, para la preparación de las muestras a liofilizar elaboramos un búfer base (tampón 10 mM TRIS-HCl y 50 mM NaCl) que suplementamos con agentes quelantes (EGTA y EDTA) y ácido rosmarínico. Todos los medios fueron ajustados a una osmolaridad de 265-270 mOsm/kg y a un pH de 8.2-8.5 (Tabla 3).

Tabla 1. Composición de los cuatro diluyentes utilizados para refrigerar semen de conejo.

	INRA 96 [®]	Glicerol	DMF	NMP
Diluyente A	100%	-	-	-
Diluyente B	94%	6%	-	-
Diluyente C	94%	-	6%	-
Diluyente D	94%	-	-	6%

Tabla 2. Composición de los cuatro diluyentes utilizados para congelar semen de conejo.

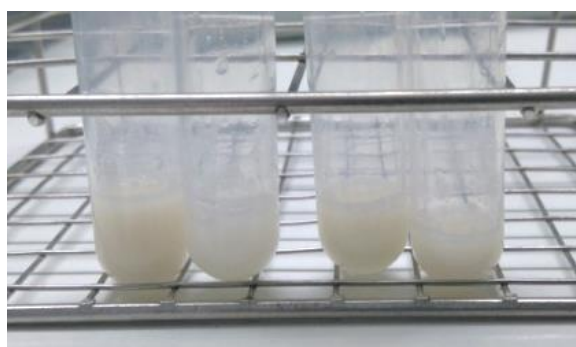
	BotuCrio [®]	INRA 96 [®]	Glicerol	DMF	NMP
Diluyente A	100%	-	-	-	-
Diluyente B	-	94%	6%	-	-
Diluyente C	-	94%	-	6%	-
Diluyente D	-	94%	-	-	6%

Tabla 3. Composición de los cuatro diluyentes utilizados para liofilizar semen de conejo.

	EGTA	EDTA	Ácido rosmarínico
EGTA	50 mM	-	-
EGTA-RA	50 mM	-	105 μ M
EDTA	-	50 mM	-
EDTA-RA	-	50 mM	105 μ M

III. Recogida de muestras seminales

Las muestras seminales se obtuvieron utilizando una vagina artificial (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) y un tubo colector (Figura 1). La temperatura de la camisa de la vagina artificial fue atemperada previamente a 42°C. Recuperado el eyaculado, se retiró la fase gelatinosa o tapón mucoso para evitar el aglutinamiento de los espermatozoides. Previo a la dilución, se realizó un análisis macroscópico de cada eyaculado para evaluar el color y volumen de la muestra, y un primer análisis microscópico para evaluar la motilidad espermática. Únicamente los eyaculados que presentasen color blanco, un volumen superior a 0.2 ml y al menos un 85% de motilidad fueron utilizados para los estudios. Tras esta primera evaluación los eyaculados se mezclaron con el propósito de eliminar la variabilidad del efecto individuo y se mantuvieron a 37°C hasta su procesado.

**Figura 1.** Tubos colectores con semen recién extraído.

IV. Procesado del semen

Las muestras heterospermicas se procesaron siguiendo los siguientes protocolos:

Protocolo de refrigeración

Las muestras espermáticas se dividieron en varios tubos eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para ser procesadas con y sin PS. Las muestras con PS se diluyeron (1:5) con los diluyentes previamente preparados (Tabla 1) y atemperados a 37°C. Por otro lado, las muestras a las que se les retiró el PS, fueron centrifugadas una única vez a 700 x g durante 10 minutos a 37°C y, tras la eliminación del sobrenadante, cada sedimento fue resuspendido (1:5) con los diluyentes específicos (Tabla 1) también previamente atemperados a 37°C. A continuación cada muestra seminal se dividió en dos tubos eppendorf con el fin de almacenar cada una a 16°C y a 4°C. El descenso de la temperatura desde los 37°C hasta los 16°C o los 4°C se realizó progresivamente en un período de tiempo de entre 90 y 120 minutos (Mocé y Vicente, 2009) para finalmente almacenar las muestras en refrigeración.

Protocolo de congelación

El procedimiento de criopreservación de muestras espermáticas se realizó siguiendo la metodología descrita previamente por Alvariño (1993) y Mocé y Vicente (2009). En esta ocasión las muestras también fueron procesadas con y sin PS. Las muestras con PS se diluyeron (1:5) con los diluyentes previamente preparados (Tabla 2) y atemperados a 37°C. Las muestras a las que se les retiró el PS, fueron centrifugadas una vez a 700 x g durante 10 minutos a 37°C y, tras la eliminación del sobrenadante, cada sedimento fue resuspendido (1:5) con los diluyentes específicos (Tabla 2) también previamente atemperados a 37°C. Todas las muestras fueron sometidas a un primer descenso gradual de la temperatura desde los 37°C hasta los 4°C en un período de tiempo de entre 90 a 120 minutos para evitar un shock térmico.

Una vez las muestras estaban a una temperatura estable de 4°C, se cargaron en pajuelas de congelación de 0.5 ml (Minitube Ibérica, Tarragona, España). Antes de sumergir las pajuelas en LN₂ para su almacenamiento a -196°C, las muestras seminales se congelaron con vapores de LN₂, colocando las pajuelas horizontalmente durante 20 minutos sobre una rejilla a 4 cm del nivel de LN₂ (Figura 2a y 2b).

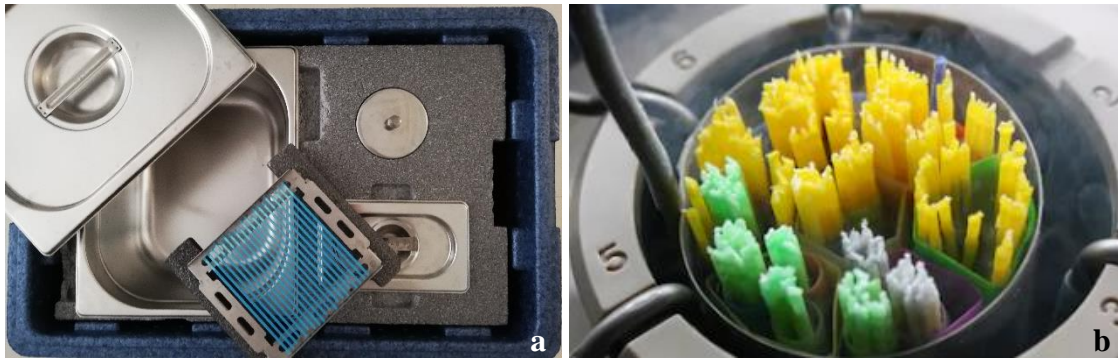


Figura 2. Unidad de congelación y rejilla con pajuelas de congelación (a) y tanque de nitrógeno líquido con pajuelas de congelación (b).

Protocolo de descongelación

Las muestras espermáticas se descongelaron colocando las pajuelas en un baño maría a 37°C durante 21 segundos. Posteriormente, se secaron las pajuelas y las muestras de semen descongelado se colocaron en tubos eppendorf ubicados en un baño maría a 37°C donde se mantuvieron hasta ser analizadas.

Protocolo de liofilización

El protocolo de liofilización se realizó siguiendo la metodología descrita por Wakayama y Yanagimachi (1998). Las muestras heterospérmicas se centrifugaron a 700 x g durante 10 minutos a 37°C, el sobrenadante fue eliminado y posteriormente, el sedimento se resuspendió en los medios de liofilización previamente preparados (Tabla 3). Una vez las muestras estaban diluidas y estabilizadas a 37°C, 150 µl de solución se decantó en crioviales de vidrio de 1 ml de capacidad (Labcon North America, California, EE.UU.). Los crioviales se sumergieron en LN₂ durante 5 minutos e inmediatamente después, las muestras congeladas fueron colocadas en el estante precongelado a -50°C de un liofilizador programable (Lyobeta 25, Telstar) (Figura 4a y 4b) instalado en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Se realizaron dos fases de secado para liofilizar las muestras: un secado primario a 0.053 mbar de presión y a -68°C y un segundo secado a 0.018 mbar de presión y a 20°C de temperatura. Tras el proceso de liofilización los crioviales se sellaron con copas de goma y Parafilm M[®] (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) y se almacenaron por duplicado en un desecador de vidrio convencional a 4°C y a temperatura ambiente.

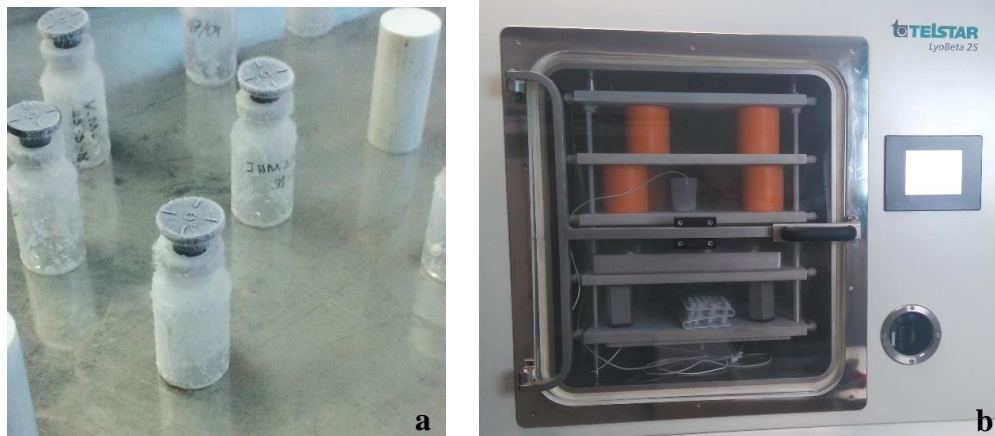


Figura 3. Crioviales congelados (a) y liofilizador programable (b).

Protocolo de rehidratación

La rehidratación de los espermatozoides de conejo liofilizados se realizó mediante la adición de 300 μl de agua Milli-Q[®] (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU.) previamente atemperada acorde con la temperatura de almacenaje de los espermatozoides liofilizados.

V. Evaluación de los espermatozoides

Para determinar la viabilidad de los espermatozoides se evaluaron los siguientes parámetros:

Motilidad y cinética

La motilidad espermática y los parámetros cinéticos se evaluaron con el sistema integrado de análisis de semen (ISAS[®]; PROISER R+D, Valencia, España) siguiendo el ajuste predeterminado específicamente para conejos. Para ello se colocaron 5 μl de semen en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de 20 x 20 mm. Las muestras se examinaron con un microscopio de contraste de fases y un aumento x100. Se capturaron cinco campos aleatoriamente y se adquirieron hasta 200 fotogramas por segundo seleccionando partículas con un área de entre 10 y 70 μm^2 . Los parámetros evaluados fueron: motilidad total (MOT; %), velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidad media (VAP; $\mu\text{m/s}$), índice de linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN=VSL/VCL; %), índice de rectitud (STR=VSL/VAP; %), índice de oscilación (WOB=VAP/VCL; %), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm) y frecuencia de batido (BCF; Hz).

Vitalidad

La vitalidad de los espermatozoides se evaluó con la tinción de eosina-nigrosina siguiendo el protocolo establecido por Bjorndahl y cols. (2003). Para ello, se colocó una alícuota de semen sobre un portaobjetos de vidrio, se mezcló con un volumen igual de suspensión de eosina-nigrosina y se hizo un frotis. Una vez el frotis estaba seco, se examinaron 100 espermatozoides por muestra con un microscopio a x400 aumentos.

Los espermatozoides vivos no tenían la membrana dañada por lo que no dejaban penetrar el colorante en su interior, de este modo la cabeza de los espermatozoides estaba sin teñir, de color blanco. Por otro lado, los espermatozoides muertos, debido al daño en la membrana, permitieron la entrada del colorante en el interior de la célula y se observaban espermatozoides con cabeza de color roja o rosa oscura (teñidos) (WHO, 2010).

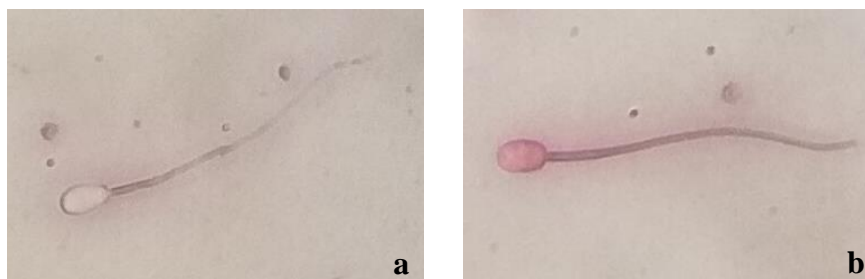


Figura 4. Espermatozoide sin teñir (a) y espermatozoide teñido (b).

Integridad de la membrana plasmática

La prueba utilizada para evaluar la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide fue el test hipoosmótico (HOS test), el cual se basa en la resistencia de la membrana plasmática cuando es sometida a un medio hipoosmótico. El test se realizó siguiendo el protocolo establecido por Jeyendran y cols. (1984) que consiste en mezclar 10 μ l de semen con 90 μ l de solución HOS (100 mM de citrato de sodio) en un tubo eppendorf y posteriormente incubar a 37°C durante 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos, se añaden 100 μ l de glutaraldehído al 2% para fijar los espermatozoides. Se colocaron 10 μ l de la mezcla sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos para examinar 100 espermatozoides por muestra mediante un microscopio de contraste de fases a x400 aumentos.

Los espermatozoides con las membranas intactas permitieron la entrada de agua dentro de ellos, dando lugar a espermatozoides hinchados con la cola en espiral (Amorim y cols., 2009; WHO, 2010).

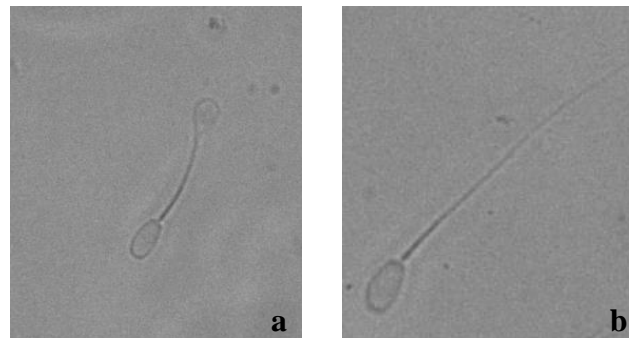


Figura 5. Espermatozoide con cola en espiral (a) y espermatozoide con cola recta (b).

Integridad del acrosoma

El protocolo desarrollado por Pursel y Johnson (1974) se basa en la fijación de los espermatozoides para apreciar la morfología y la integridad de la membrana del acrosoma. Para ello, 10 μ l de semen se fijaron con 90 μ l de glutaraldehído al 2%. Inmediatamente después, 10 μ l de la mezcla se colocó sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos para examinar 100 espermatozoides por muestra con un microscopio de contraste de fases utilizando un aumento x1000 y aceite de inmersión.

Los acrosomas se clasificaron en dos clases: acrosomas intactos (cresta apical normal) y acrosomas dañados (cresta apical dañada o ausencia de cresta apical).

Integridad del ADN espermático

El test de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCDt) específicamente diseñado para la especie *Oryctolagus cuniculus* (*O.cuniculus*-Halomax[®] kit; Halotech DNA S.L., Madrid, España) fue el utilizado para evaluar la integridad del ADN de los espermatozoides liofilizados. Esta técnica está basada en la respuesta diferencial del núcleo del espermatozoide fragmentado y no fragmentado a un tratamiento de desnaturalización del ADN. La extracción de las proteínas nucleares del espermatozoide libera los fragmentos alterados del ADN, de esta forma la cromatina se dispersa formando un halo periférico ligeramente teñido.

La evaluación de la fragmentación del ADN espermático se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se preparó el material, la solución de lisis se dejó a temperatura ambiente y los tubos con agarosa se precalentaron en baño maría entre 95 y 100°C durante 5 minutos y seguidamente se pasaron al baño maría de 37°C. Los espermatozoides liofilizados y posteriormente rehidratados se centrifugaron a 1000 x g durante 2 minutos, y tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 500 μ l

de tampón fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España). En un tubo eppendorf se introdujeron 25 μ l de las muestras espermáticas diluidas en PBS y se añadieron 50 μ l de la agarosa líquida, se homogeneizaron y se mantuvieron a 37°C. Seguidamente, se colocó una gota de 2 μ l de cada suspensión espermática dentro del pocillo marcado del portaobjetos y se cubrió con cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm. El portaobjetos se mantuvo en posición horizontal durante 5 minutos a 4°C para que se solidificase la agarosa. Pasados los 5 minutos se retiró el cubreobjetos suavemente y el portaobjetos fue sumergido completamente en 10 ml de solución de lisis durante 5 minutos. A continuación se lavaron las muestras en agua destilada durante 5 minutos y se deshidrataron por inmersión en dos baños sucesivos de etanol (70% y 100%) durante 2 minutos cada uno. Finalmente las muestras se dejaron secar al aire para posteriormente ser teñidas.

Los espermatozoides se teñieron con el kit comercial de fluorescencia verde (FluoGreen®; Halotech DNA S.L., Madrid, España). Una vez que el reactivo A se mezcló con el reactivo B en una proporción de 1:1, se colocaron 3 μ l de la mezcla en cada pocillo para teñir la cromatina espermática. Las muestras fueron evaluadas con un microscopio de fluorescencia a x400 aumentos (Olympus BX-40, Olympus U-RFL-T, Tokyo, Japón) y se contaron al menos 400 espermatozoides por muestra.

Los espermatozoides que presentaban un pequeño halo compacto alrededor del núcleo espermático tenían el ADN intacto (Figura 6a), mientras que los espermatozoides con el ADN fragmentado mostraban un halo grande y disperso (Figura 6b).

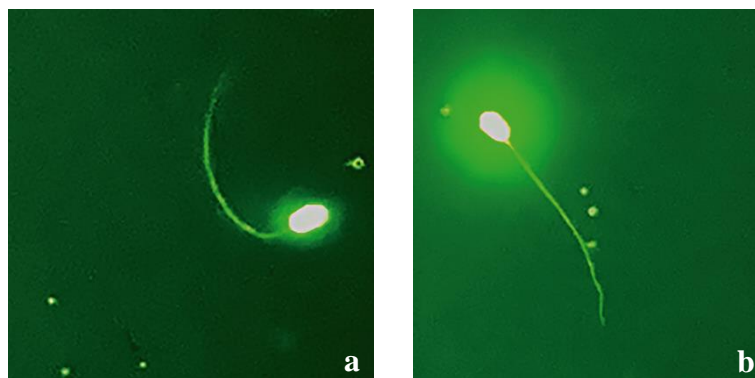


Figura 6. Espermatozoide con ADN intacto (a) y espermatozoide con ADN fragmentado (b).

Análisis estadístico

Todos los estudios se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS, versión 23 para Windows (SPSS, Chicago, EE. UU.). Los resultados correspondientes a los estudios de refrigeración y congelación se expresaron con la media \pm SEM. Los valores relativos a los efectos de los diluyentes, el PS, la temperatura y el tiempo de almacenamiento de las muestras refrigeradas y congeladas se analizaron como factores fijos en un modelo lineal general (GLM) utilizando un diseño factorial completo con interacciones entre factores. La prueba post hoc de Duncan se utilizó para evaluar el efecto del diluyente y el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, los datos relativos a la fragmentación de ADN se expresaron en porcentajes y se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson. En todos los estudios el nivel de significancia se estableció en $p < 0.050$.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Objetivo 1: Evaluar la influencia del PS y el efecto de diferentes CP (glicerol, DMF y NMP) sobre la calidad espermática durante el almacenamiento de las muestras seminales en condiciones de refrigeración.

Diseño experimental

Las muestras seminales fueron obtenidas de ocho machos reproductores de un centro de IA. Con el fin de eliminar las diferencias individuales de cada animal, las muestras fueron homogeneizadas. En el primer estudio la muestra heterospérmica se dividió en ocho fracciones. Una de ellas se diluyó (1:5) con un medio base de refrigeración (INRA 96[®]) y fue utilizada como muestra control (extender A). Las otras tres fracciones se diluyeron (1:5) con diferentes diluyentes previamente preparados, los cuales contenían INRA 96[®] y un CP al 6%: glicerol (diluyente B), DMF (diluyente C) o NMP (diluyente D). Las otras cuatro fracciones se centrifugaron una vez a 700 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se descartó para eliminar el máximo PS posible. Posteriormente, cada sedimento se resuspendió con el diluyente A, B, C o D, respectivamente. Finalmente, todas las muestras se enfriaron progresivamente de 37°C a 16°C en el transcurso de 120 minutos y se almacenaron a 16°C durante 72 horas. Los espermatozoides se analizaron a las 4, 24, 48 y 72 horas tras su recogida con el programa ISAS[®] y se realizaron las pruebas de vitalidad, HOS test e integridad acrosómica.

Resultados

Los resultados revelaron que el diluyente tuvo un papel importante sobre la calidad espermática durante el proceso de refrigeración seminal. Las muestras diluidas con el diluyente C obtuvieron resultados similares a las muestras diluidas con el diluyente control (diluyente A) en cuanto a la MOT (63.1±4.3% diluyente A; 63.4±3.7% diluyente C) y vitalidad (88.9±2.6% diluyente A; 87.7±2.7% diluyente C). Los mejores resultados relacionados con la cinética del espermatozoide como VSL (32.9±2.0 µm/s), VAP (49.1±2.5 µm/s), LIN (41.2±1.9%), STR (64.7±1.7%) y WOB (62.1±1.8%) fueron obtenidos por el diluyente A (p<0.050). Por otro lado, otros parámetros como VCL (81.3±3.8 µm/s), ALH (3.6±0.2 µm) y HOS test (74.3±2.3%) fueron significativamente (p<0.050) más altos en las muestras procesadas con el diluyente C. Las muestras diluidas

con los diluyentes B y D mostraron los peores resultados en la mayoría de los parámetros estudiados.

Aunque las muestras procesadas con y sin PS mostraron resultados bastante similares en cuanto a la MOT, vitalidad e integridad del acrosoma, los espermatozoides con PS obtuvieron mejores resultados ($p=0.020$) en la prueba de HOS test ($71.9\pm 1.6\%$ con PS; $66.5\pm 1.6\%$ sin PS). Por otro lado, los espermatozoides sin PS alcanzaron parámetros cinéticos relacionados con la velocidad y la trayectoria de los espermatozoides ligeramente más altos, específicamente en cuanto a LIN ($32.2\pm 1.2\%$ con PS; $36.3\pm 1.3\%$ sin PS), STR ($60.1\pm 1.1\%$ con PS; $62.8\pm 1.1\%$ sin PS) y WOB ($53.0\pm 1.2\%$ con PS; $56.2\pm 1.2\%$ sin PS), mostrando espermatozoides más rápidos y con trayectorias más lineales.

Con respecto a todos los parámetros espermáticos estudiados, la calidad de los espermatozoides disminuyó a la vez que avanzaba el tiempo de almacenamiento ($p<0.025$). La primera caída significativa ($p<0.001$) en la MOT se observó de las 24 ($58.4\pm 3.7\%$) a las 48 horas ($44.1\pm 3.7\%$) de almacenamiento. No obstante, la disminución más pronunciada de la MOT fue a partir de las 72 horas de almacenamiento ($27.4\pm 5.1\%$). El porcentaje de espermatozoides vivos se mantuvo hasta las 72 horas, disminuyendo ligeramente de $86.6\pm 2.7\%$ (4 horas) a $77.2\pm 2.5\%$ (72 horas). Finalmente, la membrana plasmática y acrosómica se dañaron progresivamente hasta las 72 horas, resultando un $49.5\pm 2.3\%$ de espermatozoides con la membrana plasmática intacta y un $58.1\pm 3.2\%$ de espermatozoides con el acrosoma íntegro. Otros parámetros relacionados con la cinética de los espermatozoides como VSL, LIN, STR y WOB experimentan una fuerte disminución después de 24 horas de almacenamiento. Transcurridas 48 horas de almacenamiento se observó una disminución del resto de los parámetros cinéticos estudiados (VCL, VAP, ALH y BCF).

En función a los resultados anteriormente descritos podemos decir que el PS podría ejercer una acción protectora sobre las membranas de los espermatozoides y ayudar a mantener la motilidad espermática. Por otro lado, la DMF ejerce un efecto protector sobre la membrana de los espermatozoides mejorando la calidad seminal durante la conservación de semen de conejo a 16°C .

Objetivo 2: Valorar el efecto protector del glicerol, DMF y NMP en espermatozoides de conejo refrigerados a dos temperaturas (16°C y 4°C) durante un largo período de tiempo.

Diseño experimental

Las muestras seminales se obtuvieron de ocho machos reproductores de un centro de IA. Con el fin de eliminar las diferencias individuales de cada animal, las muestras fueron homogeneizadas. La muestra espermática se dividió en cuatro fracciones y cada una de ellas se diluyó (1:5) con un diluyente diferente previamente preparado: INRA 96[®] (extender A) como control e INRA 96[®] suplementado al 6% con diferentes CP: glicerol (diluyente B), DMF (diluyente C) o NMP (diluyente D). Posteriormente, cada muestra de semen se dividió en dos tubos eppendorf para almacenar cada una a 16 y 4°C. El descenso térmico se realizó en un período de entre 90 y 120 minutos y, una vez alcanzada la temperatura deseada, se almacenaron durante 72 horas. La motilidad espermática, parámetros cinéticos, vitalidad, integridad de la membrana plasmática y del acrosoma se evaluaron a las 4, 24, 48 y 72 horas tras la obtención del semen.

Resultados

El diluyente jugó un importante papel durante el proceso de refrigeración de espermatozoides de conejo. Las muestras diluidas con el diluyente C obtuvieron resultados similares a las muestras diluidas con el diluyente control (diluyente A), sin embargo el diluyente C mantuvo mejor las membranas plasmáticas de los espermatozoides ($p < 0.050$). También se observó que el diluyente A obtuvo los mejores valores en relación a la velocidad y trayectoria de los espermatozoides. Por otro lado, las muestras diluidas con los diluyentes B y D mostraron los peores resultados.

A pesar de no observarse diferencias estadísticamente significativas entre las muestras almacenadas a 16 o 4°C en casi todos los parámetros estudiados, el parámetro BCF fue el único que difirió, siendo mayor cuando las muestras se almacenaron a 4°C en lugar de 16°C ($p < 0.001$). Cabe destacar que cuando se realizó un estudio minucioso de la interacción del diluyente con la temperatura para valorar el efecto de ambos sobre la MOT, se observó que las mejores condiciones de almacenamiento eran el uso del extender A tanto a 4 ($57.6 \pm 3.2\%$) como a 16°C ($63.1 \pm 3.7\%$) y el extender C a 16°C ($63.4 \pm 3.2\%$) ($p = 0.027$).

Con respecto a todos los parámetros espermáticos estudiados, la calidad de los espermatozoides disminuyó a la vez que avanzaba el tiempo de almacenamiento ($p < 0.050$). Se observaron dos disminuciones significativas de la MOT, la primera a las 48 horas de almacenamiento ($64.7 \pm 2.3\%$ 4 horas; $44.5 \pm 2.3\%$ 48 horas) y la más pronunciada a las 72 horas ($28.6 \pm 2.6\%$). Por otro lado, la prueba de la vitalidad mostró los mejores resultados, el porcentaje de espermatozoides vivos se mantuvo apenas intacto durante las primeras 48 horas y posteriormente empezó a disminuir, sin observarse una caída brusca. Los porcentajes de casi todos los parámetros cinéticos y la integridad del acrosoma disminuyeron después de 24 horas de almacenamiento. La membrana plasmática del espermatozoide comenzó a dañarse a las 48 horas.

Por último, también se analizó la interacción entre el diluyente utilizado y el tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras seminales. Todos los parámetros estudiados, excepto la integridad del acrosoma, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.050$). El diluyente A obtuvo el mayor porcentaje de MOT hasta las 24 horas de almacenamiento, pero transcurrido ese período de tiempo, la adición de DMF al diluyente de refrigeración INRA 96[®] mejoró la MOT siendo ésta la más alta hasta incluso transcurridas las 72 horas de almacenamiento ($p < 0.050$). El diluyente B obtuvo la peor MOT en relación con los otros diluyentes utilizados ($p < 0.050$). Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos con el diluyente A fue similar al diluyente C durante las 72 horas. Los diluyentes B y D mostraron valores similares hasta 48 horas de almacenamiento, tras 48 horas de almacenamiento, la vitalidad de los espermatozoides diluidos con diluyente B descendió significativamente ($p < 0.050$). El daño en la membrana plasmática del espermatozoide se vio significativamente reducido cuando las muestras se procesaron con el diluyente C ($p < 0.050$).

Estos resultados demostraron que la adición de DMF al diluyente INRA 96[®] ejerce un efecto protector sobre la membrana de los espermatozoides y, por lo tanto, mejora la calidad seminal. Además, NMP no podría usarse para reemplazar la DMF. Finalmente, la temperatura de almacenamiento entre 16 y 4°C no afectó la calidad de los espermatozoides de conejo.

Objetivo 3: Analizar el efecto de diferentes CP (glicerol, DMF y NMP) y del PS frente al posible shock térmico que pueden sufrir los espermatozoides durante el proceso de congelación. Determinar la viabilidad espermática en el momento de la descongelación de los espermatozoides y transcurridas 2 horas.

Diseño experimental

Las ocho muestras seminales se obtuvieron de machos reproductores de un centro de IA. Las muestras se homogeneizaron para eliminar las diferencias individuales de cada animal y posteriormente se dividieron en ocho fracciones. Una de ellas se diluyó (1:5) con un medio comercial de congelación (BotuCrio[®]) y fue utilizada como muestra control (diluyente A). Las otras tres fracciones se diluyeron (1:5) con un medio comercial de refrigeración (INRA 96[®]) y un CP: INRA 96[®] con 6% de glicerol (diluyente B), INRA 96[®] con DMF (diluyente C) e INRA 96[®] con NMP (diluyente D). Las otras cuatro fracciones se centrifugaron una vez a 700 x g durante 10 minutos a 37°C y el sobrenadante se descartó para eliminar el máximo PS posible. Posteriormente, cada sedimento se resuspendió con el diluyente A, B, C o D, respectivamente. Todas las muestras seminales se enfriaron progresivamente de 37 a 4°C y se cargaron en pajuelas de congelación de 0.5 ml. Las pajuelas se congelaron con los vapores LN₂ colocándolas a 4 cm del nivel de LN₂ durante 20 minutos y finalmente se sumergieron en el mismo para ser almacenadas a -196°C.

Al mes de la congelación, las muestras fueron descongeladas introduciendo las pajuelas en un baño maría a 37°C durante 21 segundos. Las pajuelas se secaron y colocaron en tubos eppendorf para ser analizadas mediante el programa ISAS[®] y las pruebas de vitalidad, HOS test e integridad acrosómica en el momento de la descongelación y transcurridas 2 horas.

Resultados

Las muestras seminales congeladas con el diluyente A obtuvieron los mejores parámetros cinéticos (MOT, VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) y también otros parámetros relacionados con la calidad espermática como la vitalidad e integridad del acrosoma ($p < 0.050$). Sin embargo, el diluyente B fue el que ejerció una mayor protección sobre la membrana plasmática de los espermatozoides ($p < 0.050$). Los peores resultados fueron obtenidos por el diluyente D.

La mayoría de parámetros estudiados (MOT, VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, vitalidad y HOS test) disminuyeron significativamente ($p < 0.050$) tras permanecer los espermatozoides descongelados durante 2 horas. Por el contrario, no se observó un aumento de daño en la integridad del acrosoma transcurridas las 2 horas.

También se estudió la interacción entre el diluyente utilizado y el tiempo transcurrido tras la descongelación de las muestras seminales, específicamente para la MOT. Se observó que el diluyente A alcanzó la mayor MOT en el momento de la descongelación y el diluyente D obtuvo los peores valores de MOT tanto a las 0 como a las 2 horas tras la descongelación ($p < 0.001$).

No se apreciaron diferencias significativas entre los espermatozoides de conejo procesados con o sin PS.

Estos resultados *in vitro* demuestran que el BotuCrio® es un buen diluyente para congelar semen de conejo. Además, la eliminación de PS no aporta ningún beneficio adicional por lo que el procesamiento de muestras seminales con PS facilita la técnica de criopreservación espermática en cunicultura.

Objetivo 4: Evaluar el efecto de dos agentes quelantes (EGTA y EDTA) y sustancias antioxidantes como el ácido rosmarínico sobre la integridad del ADN de espermatozoides liofilizados. Determinar la temperatura óptima de almacenamiento de espermatozoides liofilizados.

Diseño experimental

Las muestras seminales fueron obtenidas de ocho machos reproductores de un centro de IA. Las muestras se homogeneizaron para eliminar las diferencias individuales de cada animal y se dividieron en cuatro tubos. Posteriormente se centrifugaron a 700 x g durante 10 minutos a 37°C y el sobrenadante fue eliminado. Cada sedimento se resuspendió con un medio base de liofilización (10 mM Tris-HCl buffer y 50 mM NaCl) al que se le añadió 50 mM de EGTA (EGTA), 50 mM de EGTA y 105 µM de ácido rosmarínico (EGTA-RA), 50 mM de EDTA (EDTA) o 50 mM de EDTA y 105 µM de ácido rosmarínico (EDTA-RA). Las muestras se liofilizaron y se almacenaron durante 8 meses en crioviales a 4°C y a temperatura ambiente. Tras la rehidratación se analizó la integridad del ADN mediante el SCDt.

Resultados

Los espermatozoides con el ADN fragmentado mostraron un gran halo de dispersión y los espermatozoides con el ADN íntegro presentaron un halo pequeño y compacto. Los espermatozoides liofilizados con EDTA mostraron un menor porcentaje de ADN fragmentado (4.1%) que los espermatozoides liofilizados con EGTA (10.9%) ($p < 0.001$). De hecho, las muestras de semen liofilizadas con EGTA y almacenadas a 25°C fueron las que presentaron un ADN más dañado. Sin embargo, cabe destacar que cuando se añadió ácido rosmarínico al medio de liofilización EGTA y se almacenó a 25°C, el porcentaje de espermatozoides fragmentados disminuyó significativamente ($p = 0.019$). Por último, no se encontraron diferencias significativas en el almacenamiento de espermatozoides procesados con EDTA a 4°C o temperatura ambiente, ni siquiera cuando se añadió ácido rosmarínico.

Estos resultados nos demuestran que la liofilización es un método capaz de conservar material genético entre 4°C y 25°C durante largos períodos de tiempo. Por otro lado, el agente quelante EDTA es el medio más adecuado para liofilizar espermatozoides de conejo y la adición de ácido rosmarínico puede proteger el ADN en condiciones adversas.

ARTÍCULOS

Artículo 2

“Effects of seminal plasma and different cryoprotectants
on rabbit sperm preservation at 16°C”

(Exp. Anim. 67(4), 2018)

—Original—

Effects of seminal plasma and different cryoprotectants on rabbit sperm preservation at 16°C

Paula DOMINGO¹⁾, Maite OLACIREGUI¹⁾, Noelia GONZÁLEZ¹⁾, Ignacio DE BLAS²⁾, and Lydia GIL¹⁾

¹⁾Department of Animal Pathology, Obstetric and Reproduction Area, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

²⁾Department of Animal Pathology, Animal Health Area, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

Abstract: The purpose of this research was to assess whether the presence of seminal plasma (SP) can improve sperm quality of rabbit spermatozoa stored at 16°C for 72 h and moreover evaluate the cryoprotectant effects of glycerol, N-N-Dimethylformamide (DMF), and N-methyl-2-pyrrolidone (NMP). Semen samples were pooled and divided in eight fractions. Four of them were diluted with INRA (extender A), INRA with 6% glycerol (extender B), INRA with 6% DMF (extender C), or INRA with 6% NMP (extender D), respectively. The other four fractions were centrifuged, and the supernatant was removed in order to eliminate SP. Each sample was then resuspended with extender A, B, C, or D, respectively. All samples were stored at 16°C and analysed at 4, 24, 48, and 72 h by ISAS[®], vitality test, HOS test, and acrosome integrity test. After analyse of the results, SP samples showed a significantly higher percentage ($P=0.020$) in the HOS test ($71.9 \pm 1.6\%$) than non-SP samples ($66.5 \pm 1.6\%$). Non-SP samples had better results for kinematic parameters. Extenders A and C showed great results for the percentage of motile spermatozoa ($63.1 \pm 4.3\%$ and $63.4 \pm 3.7\%$, respectively), vitality ($88.9 \pm 2.6\%$ and $87.7 \pm 2.7\%$, respectively), and HOS test ($68.9 \pm 1.4\%$ and $75.2 \pm 1.4\%$, respectively). Extenders B and D showed worse data for sperm quality. These results suggest that SP has a protective effect on rabbit sperm membranes and maintains better sperm motility. The addition of glycerol and NMP to INRA does not improve rabbit sperm quality; nevertheless, the DMF cryoprotectant exerts a protective effect on the membrane of spermatozoa, improving seminal quality during rabbit sperm preservation at 16°C.

Key words: dimethylformamide, glycerol, N-methyl-2-pyrrolidone, seminal plasma, sperm preservation

Introduction

Seminal plasma (SP) is the liquid fraction of semen which is involved in sperm survival and competence, embryo development, endometrial receptivity, and ovar-

ian function in females after insemination [4, 22, 44, 45]. The constituents of SP and its functions are not completely clear in rabbits due to the lack of studies. To date fructose, sorbitol, citric acid, inositol, glycerol, ergothioneine, glutamic acid, electrolytes, glycerylphosphor-

(Received 30 November 2017 / Accepted 14 April 2018 / Published online in J-STAGE 13 June 2018)

Address corresponding: P. Domingo, Department of Animal Pathology, Obstetric and Reproduction Area, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives (by-nc-nd) License <<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>>.

©2018 Japanese Association for Laboratory Animal Science

ylcholine, proteins such as ovulation-inducing factor (OIF) [42], glycoproteins, enzymes, and minerals such as sodium, potassium, phosphorus, magnesium, calcium, and zinc are known to be included in SP [22, 41]. Each SP constituent has a different role; thus OIF is one of the main proteins which stimulates luteinizing hormone secretion, ovulation, and luteal gland development of induced and spontaneous ovulation species [1]. Additionally, OIF increases the total number of antral follicles and haemorrhagic anovulatory follicles in rabbits [42]. Conversely, SP presents a glycoprotein which reversibly inhibits the sperm capacitation process and acrosome reaction [29].

Previous studies have shown the deleterious effect of SP on preservation of bovine [18, 40], ovine [18], and equine sperm [6, 33]. In contrast, SP showed beneficial effects on buffalo [40] and Iberian red deer semen [31]. In rabbits, the presence of SP has shown a slight beneficial effect on sperm quality [2, 10, 17].

As is well known, storage temperature and the extender play an important role in spermatozoon survival [9]. Temperatures of 5°C to 25°C are suitable for rabbit sperm preservation for 72 h [25, 28, 39]. Currently, commercial artificial insemination centres carry seminal doses to other farms at a chilled temperature of around 16°C.

The characteristics of rabbit sperm (high activation energy and low water permeability coefficient) must be considered in relation to the cryoprotectants used [13, 32]. Therefore amide or methyl group cryoprotectants, which are characterised as having lower molecular weights and higher permeability, may be appropriate to use in rabbit sperm preservation [14].

N-N-Dimethylformamide (DMF) is an amide solvent that could be used to preserve mammalian sperm. Previous studies demonstrated that DMF is a better cryoprotectant than glycerol for stallion sperm [36, 37]. Conversely, it has been shown in the boar [30], dog [15, 27, 34], goat [7], and fowl [12] that sperm quality gets worse when DMF is used instead as extender for glycerol. Another amide solvent with similar characteristics to DMF is N-methyl-2-pyrrolidone (NMP). NMP presents an advantage compared with DMF: a carcinogenic nature has not been demonstrated for it to date [20].

The few studies carried out on SP and glycerol effect on rabbit sperm preservation and the absence of studies on preserving rabbit sperm with DMF or NMP as the cryoprotectant led us to investigate further the effects of

SP and these three cryoprotectants. In addition, the main importance of using rabbit sperm as a laboratory model is due to its similarity to human spermatozoa, though here are also many other advantages, such as the size of the animals themselves (small animals are easy to handle), simple manner in with to obtain samples (unlike the mouse, it is not necessary to sacrifice the animal to get sperm samples), quicker means of obtaining results (a doe's pregnancy lasts around 1 month), and the ability to perform the same experiment in other species if the results are suitable. Therefore, the purpose of this research was to determine whether there is any difference in quality of rabbit sperm stored at 16°C among samples stored with SP or without SP. Furthermore, different cryoprotectants were tested in order to determine if they have any beneficial effects on semen quality of rabbit sperm stored at 16°C for 72 h.

Materials and Methods

Chemicals

Unless otherwise stated, all the chemicals were from Panreac Quimica S.L.U. (Barcelona, Spain).

Animals

The study was performed following approval by the Veterinary Ethics Committee of the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection (RD1201/05), which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

The rabbits were housed with a controlled light cycle of 12 h light/dark, room temperature of 22–24°C, and 55–60% relative humidity in a commercial artificial insemination center (Técnicas Cunicolas S.A.). They were fed a commercial pellet diet according to their reproductive needs, and fresh water was provided *ad libitum*. Eight mature rabbits were tested previously and selected for this research.

Semen collection and processing

Semen was collected using an artificial vagina (IMV Technologies, L'Aigle, France), and any gel plugs were removed. Before dilution, macroscopic analyses of each ejaculate were performed for assessment of the colour and the volume of the sample; the first microscopic analyses of motility were also performed. Only ejacu-

lates that were white in colour, had a volume >0.2 ml, and had at least 85% motility were used for the study.

All ejaculates were pooled in order to eliminate individual differences, and afterwards heterospermic samples were divided into eight fractions. Four of them were diluted (1:5) with four different semen extenders: INRA 96® (IMV Technologies, L'Aigle, France) (extender A), INRA 96® supplemented with 6% glycerol (extender B), INRA 96® supplemented with 6% DMF (extender C), and INRA 96® supplemented with 6% NMP (extender D). The other four fractions were centrifuged once at $700 \times g$ for 10 min, and the supernatant was removed in order to eliminate the maximum SP. Then each pellet was resuspended with extender A, extender B, extender C, or extender D.

Subsequently, all samples were cooled progressively from 37°C to 16°C over the course of 120 min [32] and stored at 16°C for 72 h.

Evaluation of spermatozoa

Sperm samples were assessed at 4, 24, 48, and 72 h after collection for the different extenders with and without SP. The following tests were performed.

Sperm motility and kinematics: Sperm motility and kinematics were analysed by ISAS® software (PROISER R+D, Valencia, Spain) with the default setting specifically for rabbits. The following parameters were assessed: percentage of motile spermatozoa (MOT; %), curvilinear velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$), average path velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN=VSL/VCL; %), straightness (STR=VSL/VAP; %), wobble (WOB=VAP/VCL; %), amplitude of lateral head displacement (ALH; μm), and beat cross frequency (BCF; Hz).

Vitality: The vitality of spermatozoa was evaluated by eosin-nigrosin staining. An aliquot of semen was put on a glass slide and mixed with an equal volume of eosin-nigrosin suspension, and a smear was then made on a glass slide. Immediately after the smear was dry, 100 spermatozoa in each replicate were examined by microscope at $\times 400$ magnification and counted with the aid of a laboratory counter [8, 46]. Live spermatozoa had an undamaged membrane that could not be penetrated by the colouring agent, resulting in spermatozoa with white heads (unstained). On the other hand, dead spermatozoa had red or dark pink heads (stained) due to damage to the membrane that allowed the colouring agent to penetrate into the cell.

Sperm plasma membrane integrity: The hypo-osmotic swelling test (HOS test) was based on the resistance of the semi-permeable membrane when it was subjected to a hypo-osmotic medium [24]. In the test, 90 μl of HOS test solution (100 mM of sodium citrate) was placed into an Eppendorf tube to warm at 37°C for 5 min. Once it was heated, it was added to 10 μl of semen, and the mixture was mixed gently with a pipette and kept at 37°C for at least 30 min. Subsequently, 100 μl of 2% glutaraldehyde was added to fix the sample. Ten microliters of the mixture was placed onto a glass slide and covered with a coverslip for examination of 100 spermatozoa in each replicate by phase-contrast microscope at $\times 400$ magnification [5, 46]. Therefore, spermatozoa with intact membranes allowed an influx of water inside them resulting in swollen spermatozoa with coiled tail.

Acrosome integrity: The acrosome integrity test is used to determine the morphology of the acrosome and whether it is damaged. Ten microliters of semen was immediately fixed in 90 μl of glutaraldehyde 2% solution, and then 10 μl of the mixture was immediately placed onto a glass slide and covered with a coverslip for examination of 100 spermatozoa in each replicate by phase-contrast microscope at $\times 1,000$ magnification with immersion oil [38].

Statistical analysis

The study was replicated three times. Data were analysed using IBM SPSS Statistics 19.0 for Windows. Results were expressed as the mean \pm SEM. The values concerning the effects of the extenders, SP, and durations of storage were analysed as fixed factors in a full factorial General Linear Model (GLM), since we included all possible combinations of extenders, presence/absence of SP, and durations of storage. Duncan's post hoc test was used to evaluate the effects of the extenders and durations of storage. The interactions among the diluent used, SP presence, and storage duration were analysed using the GLM procedure. The level of significance was set at $P < 0.050$.

Results

The data obtained after analysis of motility, kinematic parameters, vitality, and membrane damage of cool rabbit sperm treated with or without SP are synthesised in Table 1 and Fig. 1. The effects of SP on the LIN, STR and WOB parameters and HOS test were statistically

Table 1. Effect of seminal plasma on kinematic parameters of rabbit spermatozoa from the four extender groups (A–D)

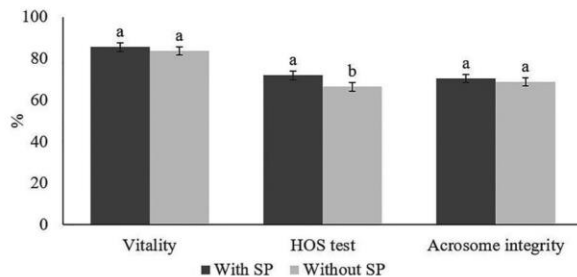
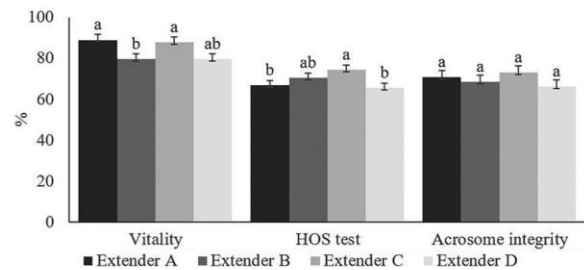
	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
With SP	52.4 ± 2.7	69.3 ± 2.8	21.9 ± 1.3	36.2 ± 1.6	32.2 ± 1.2	60.1 ± 1.1	53.0 ± 1.2	3.3 ± 0.1	7.7 ± 0.3
Without SP	47.1 ± 2.9	69.8 ± 2.9	24.5 ± 1.4	38.1 ± 1.7	36.3 ± 1.3	62.8 ± 1.1	56.2 ± 1.2	3.1 ± 0.1	7.0 ± 0.3
<i>P</i>	0.150	0.890	0.150	0.435	0.007	0.041	0.023	0.410	0.094

Data are shown as the mean ± SEM.

Table 2. Effect of extender A–D on kinematic parameters of rabbit spermatozoa from the with and without SP groups

	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Extender A	63.1 ± 4.3 ^a	76.2 ± 4.3 ^{ab}	32.9 ± 2.0 ^a	49.1 ± 2.5 ^a	41.2 ± 1.9 ^a	64.7 ± 1.7 ^a	62.1 ± 1.8 ^a	2.8 ± 0.2 ^b	7.7 ± 0.4 ^a
Extender B	28.6 ± 4.3 ^c	63.6 ± 4.3 ^{bc}	21.2 ± 2.0 ^b	34.1 ± 2.5 ^b	36.2 ± 1.8 ^b	62.1 ± 1.7 ^a	56.8 ± 1.8 ^b	3.0 ± 0.2 ^b	6.7 ± 0.4 ^a
Extender C	63.4 ± 3.7 ^a	81.3 ± 3.8 ^a	22.0 ± 1.8 ^b	39.4 ± 2.2 ^b	28.5 ± 1.6 ^c	55.9 ± 1.5 ^b	50.2 ± 1.6 ^c	3.6 ± 0.2 ^a	7.8 ± 0.4 ^a
Extender D	47.1 ± 3.7 ^a	58.7 ± 3.8 ^c	19.1 ± 1.8 ^b	29.1 ± 2.2 ^c	32.8 ± 1.6 ^{bc}	63.9 ± 1.5 ^a	51.2 ± 1.6 ^{bc}	3.2 ± 0.2 ^{ab}	7.4 ± 0.4 ^a
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009	0.161

Different letters within each column denote statistical differences ($P < 0.050$). Data are shown as the mean ± SEM.

**Fig. 1.** Effects of SP on the percentage of vitality, HOS test, and acrosome integrity of rabbit spermatozoa from the four extender groups (A–D). Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($P < 0.050$).**Fig. 2.** Percentage of vitality, HOS test, and acrosome integrity of rabbit spermatozoa diluted with extender A, extender B, extender C, or extender D from the with and without SP groups. Data are shown as the mean ± SEM. Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($P < 0.050$).

significant ($P < 0.050$). Even though SP and non-SP samples showed rather similar data for sperm quality (motility, vitality, and acrosome integrity), sperm preserved with SP showed a significantly high percentage ($P = 0.020$) in the HOS test (SP, $71.9 \pm 1.6\%$; non-SP, $66.5 \pm 1.6\%$). On the other hand, non-SP sperm had slightly higher kinetic parameters related to the velocity and trajectory of the spermatozoa, specifically the LIN (SP, $32.2 \pm 1.2\%$; non-SP, $36.3 \pm 1.3\%$), STR (SP, $60.1 \pm 1.1\%$; non-SP, $62.8 \pm 1.1\%$) and WOB (SP, $53.0 \pm 1.2\%$; non-SP, $56.2 \pm 1.2\%$), showing faster spermatozoa and with further linear trajectories.

Regardless of the presence of SP in the sample, the effect of the extender plays an important role in the quality of rabbit semen preservation according to Table 2 and Fig. 2. All the parameters studied, excepting BCF and acrosome integrity, were affected by the type of extender used ($P < 0.050$). Extender A resulted in the highest

values for kinematic parameters related to motility such as VSL ($32.9 \pm 2.0 \mu\text{m/s}$), VAP ($49.1 \pm 2.5 \mu\text{m/s}$), LIN ($41.2 \pm 1.9\%$), STR ($64.7 \pm 1.7\%$), and WOB ($62.1 \pm 1.8\%$). However, other parameters, such as VCL ($81.3 \pm 3.8 \mu\text{m/s}$), ALH ($3.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$), and the HOS test ($74.3 \pm 2.3\%$), were higher in the samples treated with extender C. On the other hand, both extenders A and C showed great results for MOT ($63.1 \pm 4.3\%$ and $63.4 \pm 3.7\%$, respectively) and vitality ($88.9 \pm 2.6\%$ and $87.7 \pm 2.7\%$, respectively). In most cases, samples diluted with extenders B and D showed worse data for sperm quality.

Considering all the sperm parameters studied, the quality of spermatozoa decreased with duration of storage ($P = 0.025$) (Table 3 and Fig. 3). The first significant ($P < 0.001$) drop in the percentage of motile sperm was observed from 24 ($58.4 \pm 3.7\%$) to 48 h ($44.1 \pm 3.7\%$).

Table 3. Effects of duration of storage on kinematic parameters from the four extender (A–D) groups and with SP and without SP groups

Duration of storage (h)	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
4	63.5 \pm 3.7 ^a	75.9 \pm 3.8 ^{ab}	33.9 \pm 1.8 ^a	47.3 \pm 2.2 ^a	44.3 \pm 1.6 ^a	71.0 \pm 1.5 ^a	61.8 \pm 1.6 ^a	3.0 \pm 0.2 ^b	9.4 \pm 0.4 ^a
24	58.4 \pm 3.7 ^a	82.4 \pm 3.8 ^a	24.2 \pm 1.8 ^b	41.2 \pm 2.2 ^a	29.5 \pm 1.6 ^b	58.5 \pm 1.5 ^b	50.1 \pm 1.6 ^c	3.6 \pm 0.2 ^a	8.4 \pm 0.4 ^a
48	44.0 \pm 3.7 ^b	66.7 \pm 3.8 ^b	18.0 \pm 1.8 ^c	31.9 \pm 2.2 ^b	28.6 \pm 1.6 ^b	56.9 \pm 1.5 ^b	49.2 \pm 1.6 ^c	3.2 \pm 0.2 ^{ab}	7.0 \pm 0.4 ^b
72	27.4 \pm 5.0 ^c	47.5 \pm 5.1 ^c	14.5 \pm 2.4 ^c	25.3 \pm 3.0 ^b	34.7 \pm 2.2 ^b	58.8 \pm 2.0 ^b	58.1 \pm 2.1 ^b	2.9 \pm 0.2 ^b	3.9 \pm 0.5 ^c
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.023	<0.001

Means marked with an asterisk within each column denote statistical differences ($P < 0.050$). Data are shown as the mean \pm SEM.

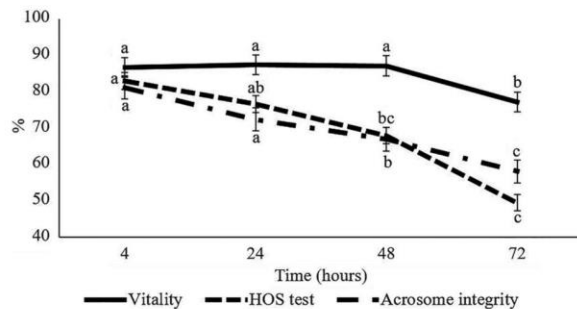


Fig. 3. Percentage of vitality, HOS test, and acrosome integrity of rabbit spermatozoa at 4, 24, 48, and 72 h from the four extender (A–D) groups and with SP and without SP groups. Data are shown as the mean \pm SEM. Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($P < 0.050$).

Nonetheless, the sharpest decline in MOT was observed at 72 h of storage (27.4 \pm 5.1% motile spermatozoa). Vitality was maintained until 72 h, dropping slightly from 86.6 \pm 2.7% live spermatozoa at 4 h to 77.2 \pm 2.5% alive spermatozoa after 72 h of storage. Finally, the sperm plasma and acrosome membranes were damaged progressively until 72 h of storage, with 49.5 \pm 2.3% and 58.1 \pm 3.2% of spermatozoa at that moment having an intact sperm plasma membrane and no damage of the acrosome membrane, respectively. Other parameters related to the kinematics of the spermatozoa, such as VSL, LIN, STR, and WOB, underwent a sharp decline after 24 h of storage. After 48 h of storage, a decrease was observed in the data for the rest of the studied kinematic parameters (VCL, VAP, ALH, and BCF).

Discussion

There are few studies about the effect of SP on rabbit semen preservation. In the present study, even though only significant differences were observed in the HOS test, the percentage of motile spermatozoa, vitality, HOS

test, and acrosome integrity values were slightly better when SP was not removed. This observation is in agreement with previous findings, such as those of Castellini *et al.* (2000) [10], who reported the effect of SP with diluents containing decreasing ratios of SP/Tris citrate-glucose and concluded that a sharp decline in motility parameters was observed at dilutions higher than 1/10 and that vitality decreased from 92 \pm 6.4% in SP samples to 48 \pm 6.4% in samples without SP that were only diluted with Tris citrate-glucose. Similarly, Aksoy *et al.* (2008) [2] studied the effect of SP removal by simple centrifugation or separation through Percoll and reported that the control group, samples without removal of the SP, had higher percentages of intact sperm head membranes (69.9 \pm 2.5%) and intact sperm plasma membranes (39.9 \pm 3.5%) than samples centrifuged (33.5 \pm 3.1% and 26.0 \pm 4.0%, respectively) or separated by Percoll (40.2 \pm 3.3% and 25.9 \pm 4.5%, respectively). Of note, the present study obtained a higher percentage of intact sperm plasma membranes than Aksoy *et al.* [2] but a similar percentage of intact acrosome membranes in samples diluted with SP. In spite of not having found great differences between samples with SP and samples without SP, all the authors agreed that SP might have a protective effect on rabbit sperm membranes and maintain greater sperm motility. This could be due to the properties of SP. To our knowledge, SP stimulates LH secretion, ovulation, and luteal gland development of induced and spontaneous ovulation species such as rabbits [1]. In addition, the process to remove SP from the samples might induce a considerable amount of stress and damage in the membranes of the spermatozoa, which would explain the decreases in MOT and the parameters which measure the integrity of the sperm plasma and acrosome membranes in non-SP samples.

Indeed, motility is not the only good parameter to analyse; other parameters related to motility such as VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, and BCF have

also been found to predict the likelihood of a spermatozoon reaching an oocyte [19, 21, 26]. To date, no kinematic parameters of rabbit spermatozoa have been studied previously by other authors. To our knowledge, the report of Castellini *et al.* [10] is the only one showing data relating kinematic parameters with the effect of SP in rabbit spermatozoa, and it noted that samples with SP had the highest values for the VAP, VCL, VSL, and LIN parameters. Hagen *et al.* [19] observed that samples with SP showed the highest percentage of motile spermatozoa and that non-SP samples diluted with BSA showed greater velocity. Other authors have studied the relationship between kinematic parameters and the *in vitro* fertilization (IVF) rate in human sperm. On one hand, Lui *et al.* (1991) [26] demonstrated that the LIN parameter was the most significant correlate of IVF rate and that VSL was also positively correlated with the IVF rate, but other parameters like ALH and VCL were not significant. On the other hand, a research performed by Hirano *et al.* (2001) [21] on human spermatozoa indicated that kinematic parameters (mostly VCL, VSL, VAP, and STR) provided a reliable estimation of the fertilizing ability of human sperm. In the present research, statistical differences ($P < 0.050$) were observed for the LIN, STR, and WOB parameters. Interestingly, in agreement with Hagen *et al.* (2002) [19], these parameters and VCL, VSL, and VAP showed greater sperm movement characteristics in samples without SP. Droplets and vesicles present in rabbit semen have similar sizes to spermatozoa and probably act to modulate the motility characteristics, capacitation process, and acrosome reaction [11, 32, 43]. Once SP is removed, droplets and vesicles in it are also eliminated, and all are replaced by an obstacle-free media. We suggest that the ease of movement in a SP, droplets, and vesicles-free media makes sperm show faster velocities and further linear trajectory parameters. Moreover, if we consider that LIN, VSL, VAP, VCL, and STR could be used to predict the fertilizing ability of the spermatozoa [21, 26], non-SP samples would be the most suitable for artificial insemination.

The extender plays an important role in seminal preservation; it should provide nutrients to sperm and protect it against cold shock. Unlike in other domestic or wild animals [7, 12, 15, 27, 30, 34], glycerol has not been the cryoprotectant of first choice for use in rabbit semen preservation due to its toxicity [13]. It is supposed that the toxic effect of glycerol on rabbit sperm is due to its

low water permeability coefficient and a high activation energy [13], triggering the denaturation of proteins, osmotic stress, alteration of actin interactions, and induction of protein-free membrane blisters [16, 23, 35]. Therefore, cryoprotectants with lower molecular weights and high permeability such amide solvents (DMF or NMP) could be suitable for use in rabbits. In this study on rabbit sperm preservation, it was observed that the DMF cryoprotectant maintained sperm quality better than glycerol, as in stallion sperm preservation [36, 37]. Furthermore, samples diluted with INRA and INRA plus DMF showed the highest percentages of motile spermatozoa and vitality; however, addition of DMF to INRA diluent had a greater protective effect on the sperm plasma membrane against the damage caused by the semen preservation procedure. Additionally, INRA showed better results for kinematics parameters such as VSL, VAP, LIN, STR, and WOD. Glycerol or NMP could not be used to replace the DMF cryoprotectant because of the poor results obtained. This demonstrated that addition of the DMF cryoprotectant to the INRA diluent has a protective effect on the membranes of spermatozoa, improving semen quality during rabbit sperm preservation. Likewise, we support the hypothesis regarding the toxicity of glycerol as a cryoprotectant in rabbit sperm preservation [3, 16, 35].

As other authors have published, the quality of spermatozoa decreased with the duration of storage [28, 39] due to the peroxidation of spermatozoa during conservation [10]. López and Alvariño (1998) [28] demonstrated that fertility also decreased when does were inseminated with samples stored for 72 h (67.6% of fertility); however, in does inseminated with samples stored for 2 or 24 h after collection, the fertility obtained was around 84%. Furthermore, Roca *et al.* (2000) [39] reported that the percentage of motile spermatozoa in semen stored over 96 h decreased from around 80% to 60–20% depending on the diluent used. As expected, in this study the sperm quality of all the samples decreased throughout storage, as other authors previously reported, showing a considerable drop after 48 h in all parameters studied.

In conclusion, both motility and kinematic parameters are useful for estimating the quality of spermatozoa during the preservation process. SP might have a protective effect on rabbit sperm membranes and maintain better sperm motility. Removal of SP from the samples in the present study required a centrifugation process which

might induce a considerable amount of stress and damage in the membranes of spermatozoa. Nevertheless, removal of SP showed a beneficial effect on kinematic parameters, suggesting that SP could affect the linear movement of spermatozoa. There were significant differences between the extenders used. The addition of glycerol and NMP cryoprotectants to the INRA diluent does not improve rabbit sperm quality. Nevertheless, the DMF cryoprotectant exerts a protective effect on the membranes of spermatozoa, improving semen quality during rabbit sperm preservation at 16°C.

Acknowledgments

The authors wish to thank Miguel Domingo, chief of the Técnicas Cunicolas S.A. farm, for assistance with the fieldwork. This study was supported by Government of Aragon Research Groups (Fondo Social Europeo, DGA) and IA2.

References

- Adams, G.P. and Ratto, M.H. 2013. Ovulation-inducing factor in seminal plasma: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 136: 148–156. [Medline] [CrossRef]
- Aksoy, M., Cankat Lechimcioglu, N., and Akman, O. 2008. Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4°C or freezing. *World Rabbit Sci.* 16: 1–6.
- Alvariño, M.R. 1993. Control de la reproducción del conejo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Alvariño, J.M.R. 2000. Reproductive performance of male rabbits. *World Rabbit Sci.* 8:(1A): 13–35.
- Amorim, E.A.M., Torres, C.A., Graham, J.K., Amorim, L.S., and Santos, L.V.L. 2009. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 111: 338–343. [Medline] [CrossRef]
- Aurich, J.E., Kühne, A., Hoppe, H., and Aurich, C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46: 791–797. [Medline] [CrossRef]
- Bezerra, F.S.B., Castelo, T.S., Alves, H.M., Oliveira, I.R.S., Lima, G.L., Peixoto, G.C.X., Bezerra, A.C.S.D., and Silva, A.R. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 63: 263–266. [Medline] [CrossRef]
- Björndahl, L., Söderlund, I., and Kvist, U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum. Reprod.* 18: 813–816. [Medline] [CrossRef]
- Carluccio, A., Robbe, D., De Amicis, I., Contri, A., Tosi, U., Russo, F., and Paoletti, M. 2004. Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Sci.* 12: 65–79.
- Castellini, C., Lattaioli, P., Moroni, M., and Minelli, A. 2000. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 275–282. [Medline] [CrossRef]
- Castellini, C., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Minelli, A., and Camici, O. 2006. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 65: 703–712. [Medline] [CrossRef]
- Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E., and Brillard, J.P. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 39: 185–191. [Medline] [CrossRef]
- Curry, M.R., Redding, B.J., and Watson, P.F. 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology* 32: 175–181. [Medline] [CrossRef]
- Darin-Bennett, A. and White, I.G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14: 466–470. [Medline] [CrossRef]
- Futino, D.O., Mendes, M.C.B., Matos, W.N.L., Mondadori, R.G., and Lucci, C.M. 2010. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 214–220. [Medline] [CrossRef]
- Gilmore, J.A., McGann, L.E., Liu, J., Gao, D.Y., Peter, A.T., Kleinhans, F.W., and Critser, J.K. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 53: 985–995. [Medline] [CrossRef]
- Gogol, P. 1999. Cryopreservation of plasma-deprived rabbit semen. *Ann. Anim. Sci.* 26: 85–92.
- Graham, J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41: 1151–1162. [Medline] [CrossRef]
- Hagen, D.R., Gilkey, A.L., and Foote, R.H. 2002. Spermatozoal velocity and motility and its relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *World Rabbit Sci.* 10: 135–140.
- Hellwig, J., Merkle, J., Klimisch, H.J., and Jäckh, R. 1991. Studies on the prenatal toxicity of N,N-dimethylformamide in mice, rats and rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 29: 193–201. [Medline] [CrossRef]
- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H., and Sato, I. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18: 215–220. [Medline] [CrossRef]
- Holtz, W. and Foote, R.H. 1978. Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. *Biol. Reprod.* 18: 286–292. [Medline] [CrossRef]
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., and Rosato, M.P. 2012. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: DIMETHYLacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 78: 1381–1389. [Medline] [CrossRef]
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M.,

- Crabo, B.G., and Zaneveld, L.J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219–228. [Medline] [CrossRef]
25. Johnke, D., de Graaf, S.P., and Bathgate, R. 2014. Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Anim. Reprod. Sci.* 147: 135–143. [Medline] [CrossRef]
26. Liu, D.Y., Clarke, G.N., and Baker, H.W.G. 1991. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J. Androl.* 12: 231–239. [Medline]
27. Lopes, K.R.F., Costa, L.L.M., Lima, G.L., Souza, A.L.P., and Silva, A.R. 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 72: 650–654. [Medline] [CrossRef]
28. López, F.J. and Alvarino, J.M.R. 1998. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours. *World Rabbit Sci.* 6: 251–253.
29. Eng, L.A. and Oliphant, G. 1978. Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol. Reprod.* 19: 1083–1094. [Medline] [CrossRef]
30. Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F., García, A., and Jerez, R.A. 2012. Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrologia* 44:(Suppl 1): 605–610. [Medline] [CrossRef]
31. Martínez-Pastor, F., Anel, L., Guerra, C., Álvarez, M., Soler, A.J., Garde, J.J., Chamorro, C., and de Paz, P. 2006. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 66: 1847–1856. [Medline] [CrossRef]
32. Mocé, E. and Vicente, J.S. 2009. Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 1–24. [Medline] [CrossRef]
33. Moore, A.I., Squires, E.L., and Graham, J.K. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 63: 2372–2381. [Medline] [CrossRef]
34. Mota Filho, A.C., Teles, C.H., Jucá, R.P., Cardoso, J.F., Uchoa, D.C., Campello, C.C., Silva, A.R., and Silva, L.D. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 76: 1367–1372. [Medline] [CrossRef]
35. Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T., Inomata, T., Kamijo, S., and Kashiwazaki, N. 2007. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp. Anim.* 56: 29–34. [Medline] [CrossRef]
36. Olaciregui, M., Gil, L., Montón, A., Luño, V., Jerez, R.A., and Martí, J.I. 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* 68: 91–95. [Medline] [CrossRef]
37. Pukazhenti, B.S., Johnson, A., Guthrie, H.D., Songsasen, N., Padilla, L.R., Wolfe, B.A., Coutinho da Silva, M., Alvarenga, M.A. and Wildt, D.E. 2014. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology* 68: 205–214. [Medline] [CrossRef]
38. Pursel, V.G. and Johnson, L.A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1: 63–68. [Medline] [CrossRef]
39. Roca, J., Martínez, S., Vázquez, J.M., Lucas, X., Parrilla, I., and Martínez, 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. [Medline] [CrossRef]
40. Sahni, K.L. and Mohan, G. 1990. Effect of removal of plasma on preservation of bovine semen. *Indian J. Anim. Sci.* 60: 783–785.
41. Setchell, B.P. 1989. Male reproductive organs and semen. In: *Reproduction in domestic animals*, 5th edition. Ed. H.H. Cole and P.T. Cupps. Academic Press. pp 229–256.
42. Silva, M., Niño, A., Guerra, M., Letelier, C., Valderrama, X.P., Adams, G.P., and Ratto, M.H. 2011. Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits? *Anim. Reprod. Sci.* 127: 213–221. [Medline] [CrossRef]
43. Sparr, E., Hallin, L., Markova, N., and Wennerström, H. 2002. Phospholipid-cholesterol bilayers under osmotic stress. *Biophys. J.* 83: 2015–2025. [Medline] [CrossRef]
44. Troedsson, M.H., Desvousges, A., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpherson, M.L., Pozor, M., and Buhi, W.C. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 171–186. [Medline] [CrossRef]
45. Waberski, D., Döhring, A., Ardón, F., Ritter, N., Zerbe, H., Schuberth, H.J., Hewicker-Trautwein, M., Weitze, K.F., and Hunter, R.H.F. 2006. Physiological routes from intra-uterine seminal contents to advancement of ovulation. *Acta Vet. Scand.* 48: 13. [Medline] [CrossRef]
46. World Health Organization Department of Reproductive Health and Research 2010. Sperm vitality. pp 26–32. In: *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th ed., WHO Press, Geneva.

Artículo 3

“Effect of glycerol, n, n-dimethylformamide and n-methyl-2-pyrrolidone on rabbit sperm stored at 4°C and 16°C”

(Animal Reproduction. En revisión)

Effect of glycerol, n, n-dimethylformamide and n-methyl-2-pyrrolidone on rabbit sperm stored at 4°C and 16°C

Paula Domingo, Maite Olaciregui, Noelia González, Ignacio De Blas, Lydia Gil.

I. SUMMARY

Artificial insemination with cooled semen is the most common practise in rabbit farms and any improvement on it helps to increase the efficiency of rabbit meat farms. Therefore, the aim of this study was to assess whether different cryoprotectant agents (CPA) as glycerol, N, N-Dimethylformamide (DMF) and N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP) can improve cooled rabbit sperm quality stored at 4°C and 16°C. Sperm samples were diluted with INRA 96[®] (Extender A), INRA 96[®] with 6% glycerol (Extender B) or 6% DMF (Extender C) or 6% NMP (Extender D) respectively, were stored at 4°C and 16°C and analysed at 4, 24, 48 and 72 hours after refrigeration by integrated sperm analysis system (ISAS[®]), eosin-nigrosin stain (vitality), hypo-osmotic swelling test (HOS test) and acrosome integrity test. As a result, Extender C showed higher percentage of motility, vitality and HOS test than extender B and D ($p < 0.050$). Whereas sperm quality decreased over time ($p < 0.050$), data showed that the addition of DMF kept the motility and sperm plasma membrane integrity after 24 hours of storage better than other diluents. These results suggest that the addition of glycerol and NMP to INRA 96[®] did not offer advantages. Nevertheless, it has been demonstrated that the addition of DMF to INRA 96[®] exerts a protective effect on the membrane of spermatozoa improving seminal quality. The temperature of storage among 4°C and 16°C did not affect the quality of rabbit sperm.

Keywords: Cryoprotectant, Dimethylformamide, N-Methyl-2-Pyrrolidone, Glycerol, Rabbit Sperm Preservation.

II. INRODUCTION

Artificial insemination (AI) with cooled semen is the most common practise in rabbit farms of European countries for the production of rabbit meat (Sinkovics et al., 1983; Alvariño, 1993; Lavara et al., 2003). The introduction of AI in rabbit farms in the 80s

lead to an increase in economic efficiency (Alvariño, 1993; López and Alvariño, 1998). Because of this, any improvement in the preservation of cooled rabbit semen helps to increase the efficiency of rabbit meat farms.

It is well known that spermatozoon survival is affected by storage temperature and extender (Carluccio et al., 2004). Cooled semen stored among 4°C and 18°C should be used up to 72 hours after collection to prevent decrease fertility (López and Alvariño, 1998; Roca et al., 2000; Johinke et al., 2014). Likewise, the extender affects sperm quality. Many extenders (López and Alvariño, 2000; Carluccio et al., 2004) and substances (Trejo et al., 2013; Johinke et al., 2014; Sariözkan et al., 2014) have been evaluated in order to preserve semen the most time possible for carry it to another farms. Nevertheless, Carluccio et al. (2004) demonstrated that INRA 96[®] kept rabbit sperm quality better than others extenders even though INRA 96[®] was made specifically for the preservation of stallion sperm.

Moreover, because of rabbit sperm characteristics (high activation energy and low water permeability coefficient), cryoprotectant agents (CPA) with lower molecular weight and higher permeability, such as amides or methyl groups, are suitable to be used (Curry et al., 1995; Mocé and Vicente, 2009).

N, N-Dimethylformamide (DMF) is an amide solvent used in chemical reactions. Previous studies on boar (Malo et al., 2009), canine (Futino et al., 2008; Lopes et al., 2009; Mota Filho et al., 2011), goat (Bezerra et al., 2011) and fowl sperm (Chalah et al., 1999) demonstrated that DMF is not better CPA than glycerol. However, stallion sperm (Olaciregui et al., 2014; Pukazhenthii et al., 2014) exposure to DMF as an alternative to glycerol showed better results. N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP) is also an amide solvent commonly used in chemical reactions as an alternative to DMF. But unlike DMF, NMP has not been studied before for storage sperm samples.

On the other hand, glycerol is the main CPA used to preserve domestic or wild animal sperm (Curry et al., 1995). Nevertheless, glycerol has not been the first CPA of choice to preserve rabbit semen due to its toxicity, which may result in osmotic stress, protein denaturation, alteration of actin interactions and induction of protein-free membrane blister that leads to get worse fertility (Alvariño, 1993; Gilmore et al., 1995; Okuda et al., 2007; Iaffaldano et al., 2012).

The lack of previous studies using DMF or NMP as a CPA in rabbit sperm preservation and the supposed toxicity of glycerol, leads to study more these CPA. The aim of this study was to assess the quality of cooled rabbit sperm stored at 4°C and 16°C and diluted with INRA 96[®] supplemented with glycerol, DMF or NMP. Moreover, evaluate the effect of storage time during 72 hours and decide whether glycerol, DMF or NMP can be used as CPA on cooled rabbit semen preservation.

III. MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Unless noted otherwise, all chemicals were from Panreac Quimica S.L.U (Barcelona, Spain).

Animals, semen collection and processing

The study was performed following approval by the Veterinary Ethical Committee of University of Zaragoza. The care and use of animals were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Rabbit sperm samples were collected from eight sexually mature bucks previously selected from a commercial AI centre (Técnicas Cunícolas S.A., Zaragoza, Spain) and used as semen donors. Males were housed in individual cages with a light cycle of 12 hours of light and 12 hours of darkness at a room temperature of 22-24°C and a relative humidity of 60-70%. All rabbits were fed a commercial pellet diet according to their reproductive condition and fresh water was provided ad libitum.

Rabbit sperm samples were collected using artificial vagina (IMV Technologies, L'Aigle, France). After semen collection, any gel plug was removed and a macroscopic analyse was performed assessing the colour and the volume of the sample. The first microscopic analyse of the motility in the farm was made as well. Only ejaculates with white colour, more than 0,2ml and good wave motion (at least 85% of motility) were used for the research.

All ejaculates were pooled with the purpose of eliminate individual differences, immediately thereafter were divided in four fractions and each one was diluted with a different extender: INRA 96[®] (IMV Technologies, L'Aigle, France) (Extender A) as control, and INRA 96[®] supplemented with 6% glycerol (Extender B), 6% DMF (Extender C) or 6% NMP (Extender D).

Subsequently, each semen sample was placed into two eppendorf tube in order to store each sample at 4°C and at 16°C. Samples were cooled progressively from 37°C to 16°C and 4°C in a time period among 90 and 120 minutes (Mocé and Vicente, 2009) and finally they were stored.

Evaluation of spermatozoa

Sperm motility, vitality, membrane integrity and acrosome integrity were assessed at 4, 24, 48 and 72 hours after collection for both temperature storage and all extenders.

- Sperm motility and kinematics

Sperm motility and kinematics parameters were evaluated by ISAS[®] (PROISER ISAS Lab CASA system, Valencia, Spain). Samples were examined by phase-contrast microscope (x100). The following parameters were assessed: percentage of motile spermatozoa (MOT), curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN=VSL/VCL), straightness (STR=VSL/VAP), wobble (WOB=VAP/VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat cross frequency (BCF).

- Vitality

Eosin-nigrosin stain was used to evaluate the vitality of the spermatozoa following the protocol described by Bjorndahl et al. (2003). According to the stain penetration through the damaged membrane the dead spermatozoa had red or dark pink heads (stained) and the live spermatozoa had white heads (unstained) (WHO, 2010).

- Sperm plasma membrane integrity

Hypo-osmotic swelling test (HOS test) was performed following the protocol established by Jeyendran et al. (1984). Ten microliters of semen were mixed with 90µl of HOS test solution (100 mM of Sodium Citrate) and kept at 37°C at least 30 minutes. Subsequently 100µl of glutaraldehyde 2% was added to the sample for fix it. Each sample was analysed

by phase-contrast microscope at x400 magnification. Spermatozoa with intact membranes allowed an influx of water inside the cell giving place to swollen spermatozoa with coiling tail (Amorim et al., 2009; WHO, 2010).

- **Acrosome integrity**

Acrosome integrity test is based on the fixation of the spermatozoa. Ten microliters of semen was immediately fixed in 90 μ l of glutaraldehyde 2% solution, right after each sample was analysed by phase-contrast microscope at x1000 magnification (Pursel and Johnson, 1974).

Statistical analysis

The study was replicated three times. Data were analysed using IBM SPSS Statistics 23 for Windows. Results were expressed as mean \pm SEM. The effect of the extender, storage temperature and time of storage on the studied parameters were analysed by ANOVA. Duncan's post-hoc test was used to evaluate the effect of the extender and time of storage. The interactions among the extender used, storage temperature and time elapsed were assessed using GLM procedure. The level of significance was set at $p < 0.050$.

IV. RESULTS

The effect of the extender played an important role in seminal preservation, in fact, all parameters studied were significantly significant ($p < 0.050$), excluding acrosome integrity parameter (Table 1 and Fig. 1). When the samples were diluted with extender C, the data obtained were similar to control samples (extender A), moreover extender C got higher percentage ($p < 0.050$) of MOT, vitality and HOS test. A few worse results of MOT, vitality and HOS test were obtained by extender D, though the worst results were observed in samples diluted with extender B. Other kinematic parameters were studied, showing extender A greater results on velocity and trajectory.

When the effect of storage temperature on cooled rabbit sperm was analysed no significant differences were observed on MOT, kinematic parameters, vitality, HOS test and acrosome integrity. With the exception of BCF parameter ($p < 0.001$), which was higher when sperm samples were stored at 4°C (8,307 \pm 0,189) instead of 16°C (7,475 \pm 0,203). In spite of no statistically differences were observed between storage

samples at 4°C or 16°C, it should be noted that studying thoroughly the interaction between the diluents and the temperature statistically differences ($p=0.027$) on MOT were shown (Fig. 2).

Regarding all sperm parameters studied, sperm quality decreased over storage time ($p<0.050$). The percentage of total sperm motility dropped off from $64.7\pm 2.3\%$ at 4 hours after collection to $44.5\pm 2.3\%$ passing 48 hours. Nevertheless, the sharpest decline of motility was from 72 hours of storage ($28.6\pm 2.6\%$ of motile spermatozoa). The vitality of spermatozoa was kept till 72 hours after storage, from $87.5\pm 1.8\%$ to $75.3\pm 1.7\%$ of live spermatozoa. Almost all kinematic parameters and acrosome integrity shown a considerable decline after 24 hours of storage. Lastly, sperm plasma membrane was started to damage as of 48 hours.

The interaction between the extender and the hours that elapsed since the collection of the samples are presented in Fig. 3. All the parameters studied, except acrosome integrity, were statistically significant ($p<0.050$) showing that as time goes by, semen quality decreases.

Extender A obtained the highest MOT up to 24 hours, but after that period of time the addition of DMF to INRA 96[®] offered higher MOT. Extender C obtained the best data on MOT at 72 hours ($40.8\pm 4.6\%$). MOT parameter was similar for extender C and D until 24 hours of storage, thereafter MOT dropped reaching less than 20% at 72 hours after collection. Extender B obtained the worst MOT in relation to other extenders ($p<0.050$) (Fig. 3a).

The percentage of alive spermatozoa obtained with extender A was similar than extender C during 72 hours (Fig. 3b). Extender B or D showed similar values till 48 hours of storage, after 48 hours of storage the vitality of spermatozoa diluted with extender B came down from $82.6\pm 3.5\%$ at 48 hours to $56.9\pm 3.5\%$ at 72 hours of storage ($p<0.050$).

The evaluation of the damage of the sperm plasma membrane is synthesise in Fig. 3c. As it is shown, extender C offered better protection on the sperm plasma membrane, observing statistically differences ($p<0.050$) after 72 hours of storage.

V. DISCUSSION

It is known that the addition of CPA to an extender is performed with the goal of protect the sperm from cryodamage, which causes devastating consequences in sperm survival during sperm cooling process. Though also, CPA, such as glycerol, could have a toxic effect on sperm (membrane destabilization, protein and enzyme denaturation, osmotic stress, alteration of actin interactions and induction of protein-free membrane blister) directly related to the concentration used and the time of cell exposure (Alvariño, 1993; Gilmore et al., 1995; Okuda et al., 2007; Iaffaldano et al., 2012). Interestingly, this study on rabbit sperm showed same results as previous studies in stallion sperm preservation (Olaciregui et al., 2014; Pukazhenthil et al., 2014): the addition of DMF maintained cooled rabbit sperm quality better than glycerol. In addition, samples diluted with INRA 96[®] plus DMF got, along with samples diluted with INRA 96[®], the best sperm quality during cooled sperm preservation. Surprisingly, sperm quality decreased when samples were diluted with INRA 96[®] plus NMP. Reminding of rabbit sperm characteristics, the most appropriate solvents to use in rabbit sperm preservation should have low molecular weight and high permeability, such as amides (Curry et al., 1995; Mocé and Vicente, 2009). Therefore, the differences found between DMF and NMP could be owing to their molecular weights and densities. Despite DMF and NMP are both an amide solvents, NMP has higher molecular weight (99.13 g/mol) and density (1.028 g/cm³) than DMF (73.09 g/mol of molecular weight; 0.944 g/cm³ of density). These small differences in their composition might suggest that are responsible for NMP not being a good CPA for storage cooled rabbit sperm. Anyhow, further studies should be carried out to determine the optimal concentration of NMP.

On the other hand, as expected glycerol got the worst data due to its toxicity previously demonstrated by other authors (Alvariño, 1993; Gilmore et al., 1995; Okuda et al., 2007), not getting nor 30% of motile rabbit sperm storing it at 16°C.

Previous studies have shown the ability of rabbit sperm to resist environmental stress. Because of the droplets and vesicles present in rabbit sperm; they are rich in cholesterol and phospholipids, assisting to modulate the membrane fluidity and in this way to withstand greater cold shock (Sparr et al., 2002; Castellini et al., 2006; Mocé and Vicente, 2009). Moreover, the high cholesterol:phospholipid ratio of rabbit sperm plasma

membrane allows the ability to fertilize oocytes from cooling sperm at 4°C is similar to fresh sperm (Mocé and Vivente, 2009). In the present study on cooled rabbit sperm, we demonstrated that there are no differences between storage rabbit sperm at 4°C or 16°C when INRA 96[®] is the extender used, contrarily other study published by Johinke et al. (2014) which using Tris-citric-acid extender with two different concentrations of glucose, obtained better results when stored rabbit sperm at 15°C instead of 5°C. Considering this, we can appreciate that the extender and CPA play an important role, moreover INRA 96[®] extender can be used satisfactorily among 4°C and 16°C.

As expected, in this study the sperm quality of all the samples decreased throughout storage time as other authors previously reported (López and Alvariño, 1998; Roca et al., 2000; Castellini et al., 2000), showing after 48 hours a considerable drop on MOT parameter. Nevertheless previous studies demonstrated that MOT is not the only good parameter to evaluate sperm quality, other parameters related with MOT such as VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH and BCF are also useful to predict male *in vitro* fertility (Liu et al., 1991; Hagen et al., 2010). To date, all kinematic parameters in rabbit spermatozoa have never been studied previously by other authors. Surprisingly, in this study we can appreciate that almost all kinematic parameters only were maintained till 24 hours, unlike vitality parameter which hardly showed a decline during 72 hours of storage. Moreover, even though the quality of all the samples decreased throughout storage time, data showed that the addition of DMF kept the motility and sperm plasma membrane integrity after 24 hours of storage better than other extenders.

Summarising, these results demonstrated that the addition of DMF to INRA 96[®] diluent exerts a protective effect on the membrane of spermatozoa and therefore it improve seminal quality. Moreover NMP could not be used to replace DMF considering that worse results were obtained. Also we are in agreement with previous results reported for the toxicity of glycerol, which made it not a good cryoprotector (Alvariño, 1993; Gilmore et al., 1995; Okuda et al., 2007). Finally, the temperature of storage among 4°C and 16°C did not affect the quality of rabbit sperm diluted with INRA 96[®].

VI. REFERENCES

- Alvariño MR. 1993. Control de la reproducción del conejo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Amorim EAM, Torres CCA, Graham JK, Amorim LS, Santos LVL. 2009. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 111:338-343.
- Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra ACSD, Silva AR. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63:263-266.
- Bjorndahl L, Soderlund I, Kvist U. 2003. Evaluation of the one step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*, 18:813-816.
- Carluccio A, Robbe D, De Amicis I, Contri A, Tosi U, Russo F, Paoletti M. 2004. Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Sci*, 12:65-79.
- 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.
- Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. 1999. In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39:185-191.
- Curry MR, Redding BJ, Watson PF. 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for Rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32:175-181.
- Fox RR. 1961. Preservation of rabbit spermatozoa: fertility results from frozen semen. *Proc Soc Exp Biol Med*, 108:663-665.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. 2008. Glycerol, Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, 45:214-220.
- Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 53:985-95.

Hagen DR, Gilkey AL, Foote RH. 2010. Spermatozoa velocity and motility and its relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *World Rabbit Sci*, 10:135-140.

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.

Jeyendran RS, Vander-Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zanevld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. *J Reprod Fertil*, 70:219-228.

Johinke D, de Graaf SP, Bathgate R. 2014. Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Anim Reprod Sci*, 147:135-143.

Lavara R, Mocé E, Vicente JS. 2003. Buenas prácticas en inseminación artificial I: Preparación de dosis seminales. “Los factores responsables de la variación de los resultados de fertilidad y prolificidad de la IA”. *Boletín de cunicultura*, 127:14-23.

Liu DY, Clarke GN, Baker HWG. 1991. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorne motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl*, 12:231-239.

Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva AR. 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 72:650-654.

López FJ, Alvariño JMR. 1998. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours. *World Rabbit Sci*, 6:251-253.

López FJ, Alvariño JMR. 2000. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Anim Reprod Sci*, 58:147-154.

Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F, García A, Jerez RA. 2009. Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrologia*, 44:605-610.

Mocé E, Vicente JS. 2009. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim Reprod Sci*, 110:1-24.

Mota Filhoa AC, Telesa CHA, Jucáa RP, Cardosob JFS, Uchoaa DC, Campello CC, Silvad AR, Silvaa LDM. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology*, 76:1367-1372.

O'Shea T, Wales RG. 1969. Further studies of the deep freezing of rabbit spermatozoa in reconstituted skim milk powder. *Aust J Biol Sci*, 22:709-719.

Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S, Kashiwazaki N. 2007. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp Anim*, 56:29-34.

Olaciregui M, Gil L, Montón A, Luño V, Jerez RA, Martí JI. 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*, 68:91-95.

Pukazhenthil BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, da Silva MC, Alvarenga MA, Wildt DE. 2014. Improved sperm cryosurvival in extenders containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology*, 68:205-214.

Pursel V, Johnson L. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1:63-68.

Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci*, 64:103-112.

Rosato MP, Rebollar PG, Iaffaldano N. 2006. Comparación de diferentes diluyentes en las características cualitativas del semen de conejo durante su conservación. XXXI Simposium de Cunicultura, ASESCU, pp.9-13.

Sarıözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. 2014. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology*, 68:349-353.

Sinkovicks G, Medgyes I, Paljak J. 1983. Some results of artificial insemination in rabbits. *J Applied Rabbit Research*, 6:43-48.

Sparr E, Hallin L, Markova N, Wennerström H. 2002. Phospholipid-cholesterol bilayers under osmotic stress. *Biophys J*, 83:2015-2025.

Trejo CA, Meza VVM, Antonio EC, Cotera RJ, Antonio-Cisneros CM. 2013. Coconut water (*Cocos Nucifera*) as a diluent for rabbit fresh semen in artificial insemination. *Arch Zootec*, 62:299-302.

WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 2010. 5th Ed. Geneva: World Health Organization. pp 26-32.

VII. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Miguel Domingo, chief of Técnicas Cunícolas S.A. farm, for his incalculable help in the fieldwork. This study was supported by Government of Aragon Research Groups (Fondo Social Europeo, DGA) and IA2.

VIII. ABBREVIATIONS

CPA: Cryoprotectant agents

DMF: N, N-Dimethylformamide

NMP: N-Methyl-2-Pyrrolidone

AI: Artificial insemination

MOT: Percentage of motile spermatozoa

VCL: Curvilinear velocity

VSL: Straight-line velocity

VAP: Average path velocity

LIN: Linearity

STR: Straightness

WOB: Wobble

ALH: Amplitude of lateral head displacement

BCF: Beat cross frequency

HOS test: Hypo-osmotic swelling test

IX. FIGURE LEGENDS

Figure 1. Percentage of vitality, HOS test and acrosome integrity of rabbit spermatozoa diluted with extender A, extender B, extender C and extender D. Data are mean \pm SEM. Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($p < 0.050$).

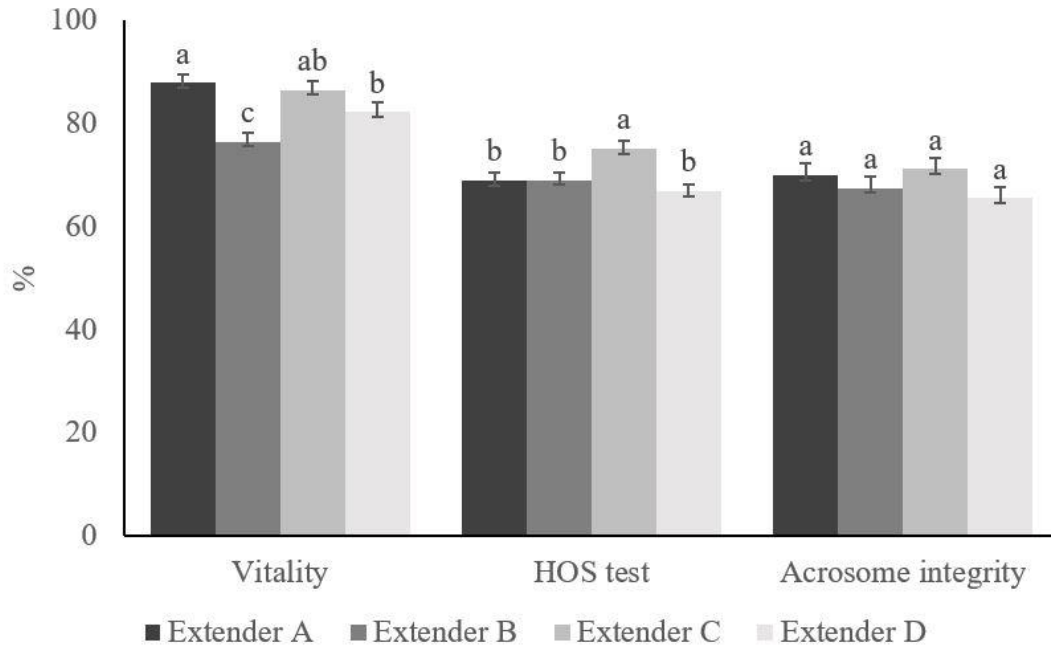


Figure 2. Effect of the temperature on the motility parameter of rabbit spermatozoa diluted with extender A, extender B, extender C and extender D. Data are mean \pm SEM. Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($p < 0.050$).

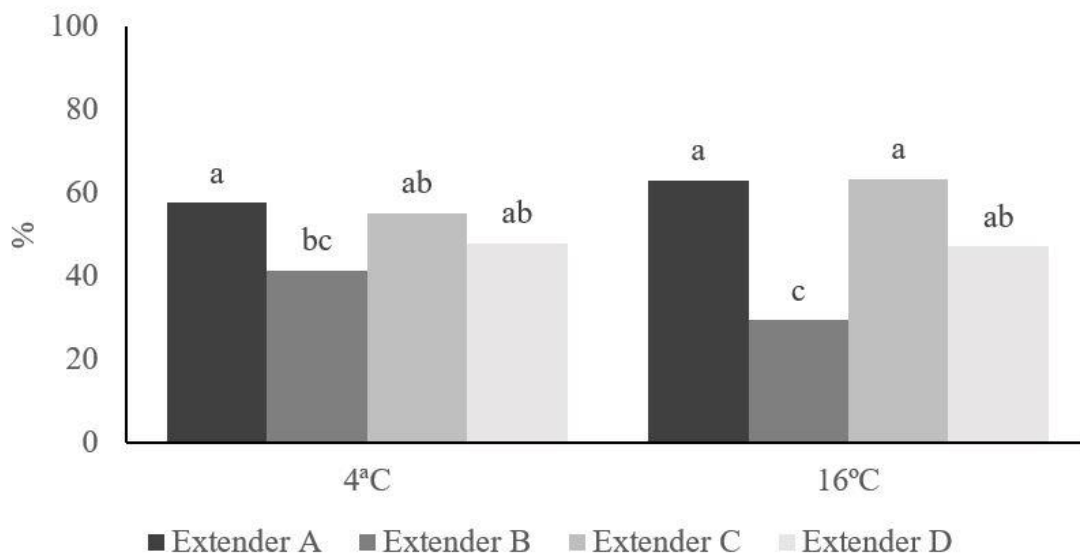
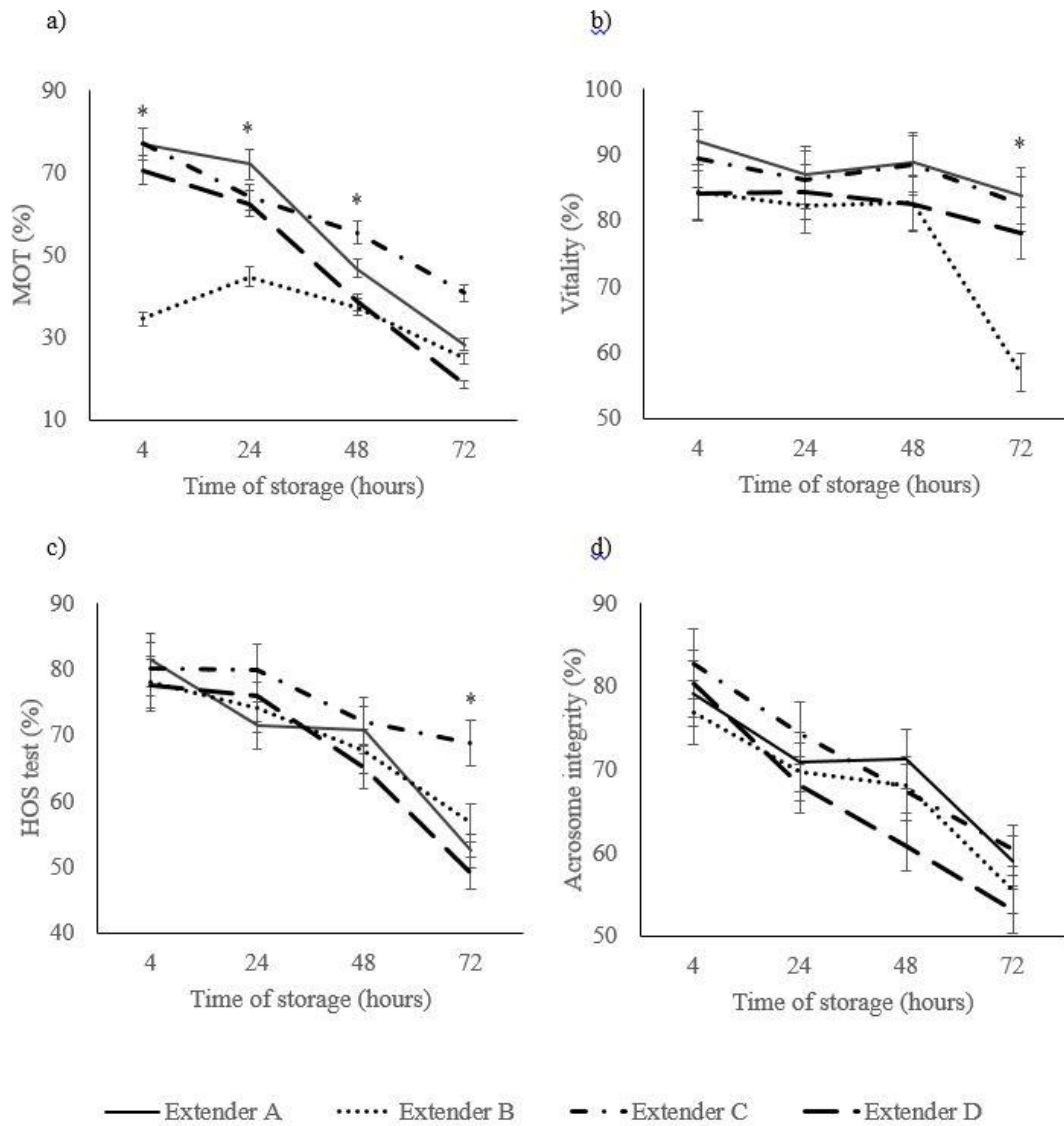


Figure 3. Effects of the interaction between the diluents used and time elapsed for the total motility (a), vitality (b), HOS test (c) and acrosome integrity (d) of rabbit spermatozoa. Data are mean \pm SEM. Means marked with an asterisk within each time point denote statistical differences ($p < 0.050$).



X. TABLES

Table 1

Effect of the extender on kinematic parameters determined by ISAS[®]. Different letters within each column indicate statistically significant differences ($p < 0.050$). Data are mean \pm SEM.

	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
Extender A	59.9 \pm 2.4 ^a	73.7 \pm 2.4 ^{ab}	26.7 \pm 1.1 ^a	43.9 \pm 1.4 ^a
Extender B	35.4 \pm 2.4 ^c	66.9 \pm 2.3 ^b	22.1 \pm 1.1 ^b	36.1 \pm 1.4 ^b
Extender C	59.3 \pm 2.2 ^a	75.5 \pm 2.3 ^a	21.5 \pm 1.1 ^{bc}	37.2 \pm 1.3 ^b
Extender D	47.5 \pm 2.2 ^b	56.7 \pm 2.3 ^c	18.9 \pm 1.1 ^c	28.3 \pm 1.3 ^c
<i>p</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>

	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Extender A	35.1 \pm 1.1 ^a	59.1 \pm 1.0 ^{bc}	58.1 \pm 1.0 ^a	2.9 \pm 0.1 ^b	7.3 \pm 0.3 ^b
Extender B	34.9 \pm 1.9 ^a	61.1 \pm 1.0 ^b	55.9 \pm 1.0 ^a	3.1 \pm 0.1 ^b	7.6 \pm 0.3 ^{ab}
Extender C	29.5 \pm 1.0 ^b	58.0 \pm 1.0 ^c	50.3 \pm 1.0 ^b	3.4 \pm 0.1 ^a	8.4 \pm 0.3 ^a
Extender D	33.9 \pm 1.0 ^a	65.9 \pm 1.0 ^a	51.5 \pm 1.0 ^b	3.0 \pm 0.1 ^b	8.3 \pm 0.3 ^a
<i>p</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>

Table 2

Effect of time of storage on MOT, kinematic parameters, vitality, HOS test and acrosome integrity. Different letters within each column indicate statistically significant differences ($p < 0.050$). Data are mean \pm SEM.

Time of storage (hours)	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
4	64.7 \pm 2.3 ^a	76.9 \pm 2.3 ^a	31.6 \pm 1.0 ^a	46.4 \pm 1.3 ^a	41.3 \pm 1.0 ^a	68.0 \pm 1.0 ^a
24	60.8 \pm 2.3 ^a	79.7 \pm 2.3 ^a	22.5 \pm 1.0 ^b	39.7 \pm 1.3 ^b	28.7 \pm 1.0 ^c	57.1 \pm 1.0 ^b
48	44.5 \pm 2.3 ^b	64.5 \pm 2.3 ^b	18.3 \pm 1.0 ^c	31.2 \pm 1.3 ^c	29.4 \pm 1.0 ^c	59.2 \pm 1.0 ^b
72	28.1 \pm 2.6 ^c	48.5 \pm 2.6 ^c	15.5 \pm 1.2 ^c	26.0 \pm 1.5 ^d	33.9 \pm 1.1 ^b	60.1 \pm 1.1 ^b
<i>p</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>

Time of storage (hours)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	Vitality (%)	HOS test (%)	Acrosome integrity (%)
4	60.2 \pm 1.0 ^a	3.1 \pm 0.1 ^b	9.3 \pm 0.3 ^a	87.5 \pm 1.8 ^a	79.2 \pm 1.4 ^a	79.7 \pm 2.2 ^a
24	50.0 \pm 1.0 ^c	3.5 \pm 0.1 ^a	8.4 \pm 0.3 ^b	84.8 \pm 1.9 ^a	75.3 \pm 1.4 ^a	70.8 \pm 2.2 ^b
48	49.2 \pm 1.0 ^c	3.1 \pm 0.1 ^b	7.9 \pm 0.3 ^b	85.5 \pm 1.7 ^a	68.8 \pm 1.4 ^b	66.8 \pm 2.2 ^b
72	56.1 \pm 1.1 ^b	2.8 \pm 0.1 ^b	5.7 \pm 0.3 ^c	75.3 \pm 1.7 ^b	56.7 \pm 1.5 ^c	57.0 \pm 2.2 ^c
<i>p</i>	<i>0.001</i>	<i>0.023</i>	<i>0.001</i>	<i>0.017</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>

Artículo 4

“Comparison of different semen extenders and cryoprotectant agents to enhance the cryopreservation of rabbit spermatozoa”

(Czech J. Anim. Sci., 2018)

Comparison of different semen extenders and cryoprotectant agents to enhance the cryopreservation of rabbit spermatozoa

Paula Domingo, Maite Olaciregui, Noelia González, Ignacio De Blas, Lydia Gil

I. ABSTRACT

The purpose of this research was to find a suitable protocol to enhance frozen rabbit sperm preservation analysing the role that seminal plasma (SP) plays and the effect of different cryoprotectant agents on sperm quality 0 and 2 hours after thawing. Sperm samples were pooled and divided in eight fractions. Four of them were diluted with BotuCrio[®] (extender A), INRA 96[®] plus 6% glycerol (extender B), 6% N, N-Dimethylformamide (extender C) and 6% N-methyl-2-pyrrolidone (extender D) respectively. The other four fractions were centrifuged and the supernatant was discarded in order to eliminate SP. Each sample was then resuspended with extender A, B, C and D. Samples were cooled progressively, loaded into 0.5ml freezing straws and frozen with liquid nitrogen vapour. Thawing was performed by placing the straws into a bain-marie at 37°C for 21 seconds. Straws were dried and sperm samples placed into eppendorf tubes to be analyzed by ISAS[®] software, vitality test, HOS test and acrosome integrity test. After the results, the highest data on motility and velocity parameters was obtained by extender A ($P < 0.050$) even when the motility parameter was compared with previous studies using other diluents. Additionally, sperm quality decreased over incubation time ($P < 0.050$) and no differences were found in samples processed with or without SP. This research reveal that BotuCrio[®] could be used for rabbit sperm cryopreservation and moreover the improvement of the cryopreservation process of rabbit sperm due to the demonstration that SP removing is not required.

Keywords: Botucio[®]; Cryoprotectant; Dimethylformamide; Glycerol; N-methyl-2-pyrrolidone; Rabbit Sperm Preservation.

II. INRODUCTION

Assisted Reproductive Technologies in mammals have been steadily progressing over the years for maintaining and preserving breeds on the verge of extinction. Moreover, a necessity of transport genetic resources all over the world instead of live animals leads to develop an alternative technology. A possible alternative may be sperm cryopreservation

which is an economy method able to preserve gene resources and carry sperm between remote destinations. However, due to the issues associated with the use of freeze-thawed sperm (lower fertility and prolificacy than cooled sperm), artificial insemination with cryopreserved rabbit sperm has not been used for commercial purposes at present (López and Alvariño 1998; Mocé and Vicente 2009).

During the freeze-thawing procedure intracellular ice crystals are formed in mammalian sperm cells causing cell destruction and membrane damage (Fuller and Paynter 2004; Hernández et al. 2012). To avoid this severe irreversible damage it is necessary to enhance cryopreservation protocols by adding new suitable cryoprotectant agents (CPA).

Glycerol has been the main CPA used to preserve domestic or wild animal sperm (Curry et al. 1995). Nevertheless, glycerol has not been the first CPA of choice to preserve rabbit semen due to its toxicity, which may result in osmotic stress, protein denaturation, alteration of actin interactions and induction of protein-free membrane blister that leads to get worse fertility (Alvariño 1993; Gilmore et al. 1995; Iaffaldano et al. 2012). Negative effects of glycerol may be related with the high molecular weight which leads to permeating the cell membrane more slowly than other CPA (Gilmore et al. 1995). Consequently the ideal CPA should have low molecular weight and high permeability (Darin-bennet and White 1977). Amide or methyl groups have lower molecular weight and greater water solubility than glycerol being able to reduce osmotic damage (Curry et al. 1995; Mocé and Vicente 2009).

An amide solvent that could be used as an alternative to prepare freezing extenders and reduce membrane damage caused during the procedure is N, N-Dimethylformamide (DMF). To date, no studies were performed using DMF as CPA for rabbit sperm cryopreservation. Nevertheless, the efficacy of DMF to cryopreserve sperm has been studied on stallion (Olaciregui et al. 2014), boar (Malo et al. 2009), dog (Lopes et al. 2009), goat (Bezerra et al. 2011) and fowl (Chalah et al. 1999).

Another amide solvent commonly used in chemical reactions is N-methyl-2-pyrrolidone (NMP). Despite having similar characteristics to DMF no previous studies have been performed.

The lack of efficient cryopreservation protocols in rabbits along with the few studies carried out on glycerol effect in rabbit sperm cryopreservation and the absence of studies on preserving frozen rabbit sperm with DMF or NMP, led to investigation the effect of

these three CPA. Therefore, the purpose of this research was to find a suitable protocol to enhance frozen rabbit sperm preservation analysing the role that SP plays and furthermore the effect of different CPA on sperm quality 0 to 2 post-thaw.

III. MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Unless noted otherwise, all chemicals were from Panreac Quimica S.L.U (Barcelona, Spain).

Animals

The study was performed following approval by the Veterinary Ethical Committee of University of Zaragoza. The care and use of animals were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Eight Californian-New Zeland white hybrid bucks previously selected from a commercial AI centre (Técnicas Cunícolas S.A., Zaragoza, Spain) were used as donors. Males were housed in individual cages with a light cycle of 12 hours light/dark at a room temperature of 22-24°C and a relative humidity of 60-70%. All rabbits were fed a commercial pellet diet according to their reproductive condition and fresh water was provided *ad libitum*.

Semen collection and processing

Semen was collected using artificial vagina (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) at 50°C and any gel plug was removed. Before dilution, a microscopic analyse of the motility and a macroscopic analyse to evaluate the colour and the volume of the sample were performed in the farm. Only white colour ejaculates with at least of 0.2ml and 85% of motility were used for the research. All ejaculates were pooled to eliminate individual differences.

Experimental design

Figure 1 illustrates the experimental design. Pooled semen samples were divided into eight fractions, four of them were diluted (1:5) at room temperature with four different semen extenders: BotuCrio[®] (Nidacon, Mölndal, Sweden: 1% glycerol and 4% methylformamid) (Extender A), INRA 96[®] (IMV Technologies, L'Aigle, France:

purified fraction of milk micellar proteins) supplemented with 6% glycerol (Extender B), INRA 96[®] supplemented with 6% DMF (Extender C) and INRA 96[®] supplemented with 6% NMP (Extender D). The other four fractions were centrifuged once at 700x g for 10 minutes at 37°C, and the supernatant was discarded to eliminate SP. Then each pellet was resuspended (1:5) with extender A, extender B, extender C and extender D.

Freezing and thawing protocol

Cryopreservation procedure was performed as previously described (Alvariño 1993; Mocé and Vicente 2009). Briefly, samples were cooled progressively from 37°C to 4°C over 90 to 120 minutes and loaded into 0.5 ml freezing straws (Minitube Iberica, Tarragona, Spain). Freezing straws were frozen horizontally in racks placed 4 cm above the surface of liquid nitrogen (LN₂) for 20 minutes and then plunged into LN₂ (-196°C) for storage. After 1 month, samples were thawed by placing the straws into a bain-marie at 37°C for 21 seconds. Straws were dried and sperm samples placed into eppendorf tubes located into a bain-marie at 37°C. Thawed samples were maintained at 37°C and analyzed immediately after thawing and past 2 hours.

Evaluation of spermatozoa

Sperm motility, kinematic parameters, vitality, membrane integrity and acrosome integrity of all the samples were assessed immediately after thawing and past 2 hours.

- Assessment of sperm motility and kinematic parameters

Sperm motility and kinematics parameters were evaluated by ISAS[®] software (PROISER R+D, Valencia, Spain) following the default setting specifically for rabbits. Five microliters was placed on a slide and covered with 20 × 20mm coverslip. Five fields were randomly captured at ×10 magnification by phase-contrast microscope. Up to 200 frames per second were acquired selecting particles with an area of between 10 and 70µm². The linearly motile sperm were deviated <45% from a straight line. The analyses provided information about the percentage of motile spermatozoa (MOT, %), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight-line velocity (VSL, µm/s), average path velocity (VAP, µm/s), linearity (LIN=VSL/VCL, %), straightness (STR=VSL/VAP, %), wobble (WOB=VAP/VCL, %), amplitude of lateral head displacement (ALH, µm) and beat cross frequency (BCF, Hz).

- **Assessment of vitality**

Eosin-nigrosin stain was used to evaluate the vitality of the spermatozoa following the protocol described by Bjorndahl et al. (2003). An aliquot of semen was put over a glass slide, mixed with an equal volume of eosin-nigrosin suspension and made a smear on a glass slide. Immediately after the smear was dry, 100 spermatozoa in each replicate were examined by microscope at $\times 400$ magnification and counted on the aid of a laboratory counter. Live spermatozoa had white heads and dead spermatozoa had red or dark pink heads.

- **Assessment of sperm plasma membrane integrity**

Hypo-osmotic swelling test (HOS test) was performed following the protocol established by Jeyendran et al. (1984). Briefly, 90 μ l of HOS test solution (100mM of Sodium Citrate) was placed into an eppendorf tube to warm at 37°C for 5 minutes. Once it was heated, it was added to 10 μ l of semen, and the mixture was mixed gently with the pipette and kept at 37°C for least 30 minutes. Subsequently, 100 μ l of 2% glutaraldehyde solution was added to fix the sample. Ten microliters of the mixture was placed onto a glass slide and covered with a coverslip for examine 100 spermatozoa in each replicate by phase-contrast microscope at $\times 400$ magnification. Spermatozoa with intact membranes allowed an influx of water inside them resulting in swollen spermatozoa with coiled tail (Amorim et al. 2009).

- **Assessment of acrosome integrity**

The protocol developed by Pursel and Johnson (1974) based on the fixation of the spermatozoa to appreciate the morphology and the integrity of acrosome membrane. Ten microliters of semen was immediately fixed in 90 μ l of glutaraldehyde 2% solution, right after 10 μ l of the mixture was placed onto a glass slide and covered with a coverslip for examine 100 spermatozoa in each replicate by phase-contrast microscope at $\times 1000$ magnification and immersion oil. Acrosomes were differentially categorized into two classes: intact acrosome (normal apical ridge) and damaged acrosome (damaged apical ridge and/or missing apical ridge).

Statistical analysis

The study was replicated three times. Data were analysed using IBM SPSS 19.0 software for Windows (SPSS, Chicago, USA). Results were expressed as mean \pm SEM. The effect of the extender, SP and time elapsed after thawing on all the parameters were analysed

by a General Linear Model (GLM) using a complete factorial design with interactions between factors. Duncan's post-hoc test was used to evaluate the effect of the extender. The level of significance was set at $P<0.050$.

IV. RESULTS

The comparison between the treatments showed extender A obtained the highest data ($P<0.050$) on kinematic parameters as MOT, VCL, VSL, VAP, ALH and BCF (Table 1) and also on other sperm quality parameters like vitality and acrosome integrity (Figure 2). Nevertheless, as shown Figure 2, the greatest protection of sperm plasma membrane was performed by extender B and samples diluted with extender D showed the worst data on sperm quality.

As expected, almost all sperm parameters lessened past 2 hours thawed. Kinematic parameters like MOT ($32.5\pm 1.4\%$ at 0h; $15.4\pm 1.4\%$ at 2h), VCL ($53.1\pm 1.5\mu\text{m/s}$ at 0h; $32.8\pm 1.5\mu\text{m/s}$ at 2h), VSL ($17.1\pm 0.4\mu\text{m/s}$ at 0h; $13.1\pm 0.4\mu\text{m/s}$ at 2h), VAP ($29.8\pm 0.7\mu\text{m/s}$ at 0h; $21.5\pm 0.5\mu\text{m/s}$ at 2h), ALH ($2.7\pm 0.1\mu\text{m}$ at 0h; $2.4\pm 0.1\mu\text{m}$ at 2h) and BCF ($5.6\pm 0.3\text{Hz}$ at 0h; $3.2\pm 0.3\text{Hz}$ at 2h) significantly decreased ($P<0.050$) past 2 hours thawed nonetheless, other kinematic parameters as LIN ($32.8\pm 0.9\%$ at 0h; $41.2\pm 0.9\%$ at 2h), STR ($57.6\pm 0.9\%$ at 0h, $61.1\pm 0.8\%$ at 2h) and WOB ($56.7\pm 0.9\%$ at 0h; $67.2\pm 0.8\%$ at 2h) raised significantly ($P<0.050$) after 2 hours post thawing. Sperm vitality and plasma membrane were affected by the time elapsed after thawing ($P<0.050$) (Figure 3). Conversely, integrity of acrosome membranes was maintain 2 hours post-thaw.

The interaction between the extender and the time after thawing was analysed. There was found significant difference ($P<0.001$) in the percentage of motile spermatozoa between sperm immediately post-thaw and sperm after 2 hours incubation post-thaw in every group (extender) (Table 2). The highest percentage of motile spermatozoa was reached by extender A at 0 hours after thawing ($52.9\pm 2.8\%$). Extender D got the worst values at 0 and 2 hours post-thaw.

Regarding all sperm parameters studied, significant differences between freeze-thawed rabbit sperm samples processed with or without SP were not appreciated (Table 3).

V. DISCUSSION

Sperm cryopreservation technique is used for conservation of banking resources (endangered breeds or high-value males), animal genetic diffusion between countries (semen from selected lines) and research. On account of the lack of an efficient cryopreservation method, many authors have tried to improve it by testing extenders (López and Alvariño 2000; Carluccio et al. 2004) and CPA (Dalimata and Graham 1997; Rosato and Iaffaldano 2013; Johnke et al. 2014; Nishijima et al. 2015). Nevertheless, Carluccio et al. (2004) demonstrated that INRA 96[®] diluent maintained chilled rabbit sperm quality better than others even though it was made specifically for chilling stallion sperm preservation. To avoid cryodamage caused during freeze-thawing sperm process some CPA should be added to chilling diluent (Fuller and Paynter 2004; Hernández et al. 2012). Additionally, there are extenders ready to use in sperm cryopreservation such as BotuCrio[®] which is composed of lower concentration of glycerol (1%) and amides (4%). In this study has been observed that the addition of CPA as 6% of glycerol, DMF or NMP to INRA 96[®] (specific diluent to preserve cooled sperm) were not suitable to maintain sperm quality during freeze-thawing procedure as well as BotuCrio[®] (specific diluent to preserve frozen sperm). The highest data on motility and velocity parameters (VCL, VSL and VAP) obtained by BotuCrio[®] confirmed the hypothesis of Salmani et al. (2014) suggesting that high concentrations of CPA may increase the viscosity of the media and therefore decrease the velocity and movement characteristics of spermatozoa. And furthermore, the different concentration of glycerol contained in BotuCrio[®] (1% glycerol) and extender A (6% glycerol) could be one of the reasons for BotuCrio[®] maintain better sperm quality than extender A, supporting other authors who demonstrated that the toxic effect of glycerol on rabbit sperm is directly related to the concentration and the time of cell exposure (Alvariño 1993, Swain 2010).

To highlight, other studies in stallion sperm cryopreservation (Olaciregui et al. 2014) suggested that DMF should be used to cryopreservation; contrary in other animal species like boar (Malo et al. 2009), canine (Lopes et al. 2009), goat (Bezerra et al. 2011) and fowl (Chalah et al. 1999) concluded that glycerol was more suitable CPA than DMF for sperm cryopreservation. In our study significant differences were not found between glycerol or amide solvents (DMF and NMP). These results differ from other authors such as Curry et al. 1995 and Mocé and Vicente 2009 suggesting that the most appropriate solvents to use in rabbit sperm cryopreservation should have low molecular weight and

high permeability as amide solvents. Moreover, these results suggested that the differences in fatty acid composition and sterol levels of mammals sperm membrane (Darin-Bennet and White 1977) make every animal species requires a specific CPA according to their needs.

The motility is one of the most studied parameters which is related directly to sperm quality. Dalimata and Graham (1997) studied the cryopreservation of rabbit spermatozoa using different CPA concluding that the combination of cell permeating CPA (acetamide) with cell non-permeating CPA (trehalose and methyl cellulose) was the most effective media for rabbit sperm cryopreservation reaching $46\pm 3\%$ of motile spermatozoa after thawing. Similarly results were found by Rosato and Iaffaldano (2013) using 0.1M trehalose to freeze-thawed rabbit sperm (45% of MOT) and Nishijima et al. (2015) demonstrating that 1.5% of lecithin could be used as a CPA to freeze-thawed rabbit sperm ($34.3\pm 7.3\%$ of MOT). Two interesting researches were performed by Kulíková et al. One was published in 2015 where they studied the cryoprotective effect of Ficoll (non-permeable CPA) on the rabbit spermatozoa quality, as a result Kulíková et al. achieved 50.93% of motile sperm 0 minutes after thawing and 26.93% of MOT after 2 hours post thaw. A recent research was published in 2017, where Kulíková et al. demonstrated no breed effect (Nitra and Zobor rabbit) on motile sperm after thawing, no reaching 40% of motile spermatozoa immediately post thaw. Interestingly comparing with available publications, this research achieved the highest percentage of MOT ($52.9\pm 2.8\%$) processing rabbit sperm samples with BotuCrio[®].

As other authors have published, the sperm quality decreased past 2 hours at 37°C thawed (Kulíková et al. 2015; Hall et al. 2017) may be due to the peroxidation of spermatozoa during the conservation (Darin-Bennet and White 1977; Castellini et al. 2006). In spite of almost all parameters decreased, there was not observed a significant alteration on the membrane of the acrosome after 2 hours thawed. This appreciation along with the good percentage of alive and motile spermatozoa suggests that frozen sperm samples thawed during 2 hours may be able to use for artificial insemination. Naturally, the faster artificial insemination with thawed sperm is performed, higher fertility rate will be obtained.

In the present experiment the elimination of SP prior to cryopreservation did not exert a beneficial effect on sperm survival post freeze-thawing procedure. This observation is in agreement with previous findings of Gogol (1999), reporting that freeze-thawed samples

processed with SP obtained similar fertility (81%) than samples without SP (77%). Similarly Dalimata and Graham (1997) and Aksoy et al. (2008) came to the conclusion that a detrimental effect of SP removing during cryopreservation process on sperm fertilizing ability seems unlikely. For that reason, despite SP containing beneficial components for sperm, this results suggest that it is not necessary to remove SP during cryopreservation process what would diminish and facilitate freeze-thawing sperm protocol.

VI. CONCLUSION

To our knowledge BotuCrio[®] has never been studied for freezing rabbit sperm and whilst it is a commercial diluent for stallion sperm cryopreservation, the finding of this research is very important revealing that BotuCrio[®] is a good extender for using in freeze-thawing rabbit sperm procedure. Anyhow, further studies should be carried out to confirm this results by in vivo experiments and determine the optimal concentration of glycerol, DMF and NMP cryoprotectants. Additionally, artificial insemination with frozen sperm should perform immediately after thawing and the elimination of SP is not necessary making easier the cryopreservation process of rabbit sperm.

VII. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Miguel Domingo, chief of Técnicas Cunicolas S.A. farm, for his incalculable help in the fieldwork. This study was supported by Government of Aragon Research Groups (Fondo Social Europeo, DGA) and IA2.

VIII. REFERENCES

- Alvariño M.R. (1993): Control de la reproducción del conejo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Amorim E.A.M., Torres C.C.A., Graham J.K., Amorim L.S., Santos L.V.L. (2009): The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 11, 338-343.
- Aksoy M., Cankat Lechimcioglu N., Akman O. (2008): Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4°C or freezing. *World Rabbit Science*, 16, 1-6.

Bezerra F.S.B., Castelo T.S., Alves H.M., Oliveira I.R., Lima G.L., Peixoto G.C., Bezerra A.C., Silva A.R. (2011): Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63, 263-266.

Bjorndahl L., Soderlund I., Kvist U. (2003): Evaluation of the one step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18, 813-816.

Carluccio A., Robbe D., De Amicis I., Contri A., Tosi U., Russo F., Paoletti M. (2004): Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Science*, 12, 65-79.

Castellini C., Pizza F., Theau-Clément M., Lattaioli P. (2006): Effect of different number of frozen spermatozoa inseminated on the reproductive performance of rabbit does. *Theriogenology*, 66, 2182-2187.

Chalah T., Seigneurin F., Blesbois E., Brillard J.P. (1999): In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39, 185-191.

Curry M.R., Redding B.J., Watson P.F. (1995): Determination of water permeability coefficient and its activation 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 methyl cellulose. *Theriogenology*, 48, 831-41.

Darin-Bennett A., White I.G. (1977): Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14, 466-470.

Fuller B., Paynter S. (2004): Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*, 9, 680-691.

Gilmore J.A., McGann L.E., Liu J., Gao D.Y., Peter A.T., Kleinhans F.W., Critser J.K. (1995): Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 53, 985-995.

Gogol P. (1999): Cryopreservation of plasma-deprived rabbit semen. *Annals of Animal Science*, 26, 85-92.

- Hall S.E., Negus C., Johnke D., Bathgate R. (2017): Adjusting cryodiluent composition for improved post-thaw quality of rabbit spermatozoa. *PLoS One*, 20, 12.
- Hernández P.J.E., Fernández R.F., Rodríguez S.J.L., Negrete R.M., Soto M.Y.G., García R.A.D. (2012): Effect of cryopreservation on viability and the acrosomal state of New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen. *Revista Salud Animal*, 34, 188-191.
- 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.
- Jeyendran R.S., Vander-Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zanevld L.J.D. (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:j, 219-228.
- Johnke D., de Graaf S.P., Bathgate R. (2014): Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Animal Reproduction Science*, 147, 135-143.
- Kulíková B., Di Iorio M., Kubovicova E., Kuzelova L., Iaffaldano N., Chrenek P. (2015): The cryoprotective effect of Ficoll on the rabbit spermatozoa quality. *Zygote*, 23, 785-794.
- Kulíková B., Oravcová M., Baláži A., Supuka P., Chrenek P. (2017): Factors affecting storage of Slovak native rabbit semen in the gene bank. *Zygote*, 25, 592-600.
- Lopes K.R.F., Costa L.L.M., Lima G.L., Souza A.L.P., Silva A.R. (2009): Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 72, 650-654.
- López F.J., Alvariño J.M.R. (1998): Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours. *World Rabbit Science*, 6, 251-253.
- López F.J., Alvariño J.M.R. (2000): Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated Rabbit semen. *Animal Reproduction Science*, 58, 147-154.

Malo C., Gil L., Cano R., Martínez F., García A., Jerez R.A. (2009): Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrologia*, 44, 605-610.

Mocé E., Vicente J.S. (2009): Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110, 1-24.

Nishijima K., Kitajima S., Koshimoto C., Morimoto M., Watanabe T., Fan J., Matsuda Y. (2015): Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*, 84, 1172-5.

Olaciregui M., Gil L., Montón A., Luño V., Jerez R.A., Martí J.I. (2014): Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*, 68, 91-95.

Pursel V., Johnson L. (1974): Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1, 63-68.

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, 508-16.

Salmani H., Towhidi A., Zhandi M., Bahreini M., Sharafi M. (2014): In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68, 276-80.

Swain J.E., Smith G.D. (2010): Cryoprotectants. In *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press.

IX. FIGURE LEGENDS

Figure 1. Recap of the experimental design.

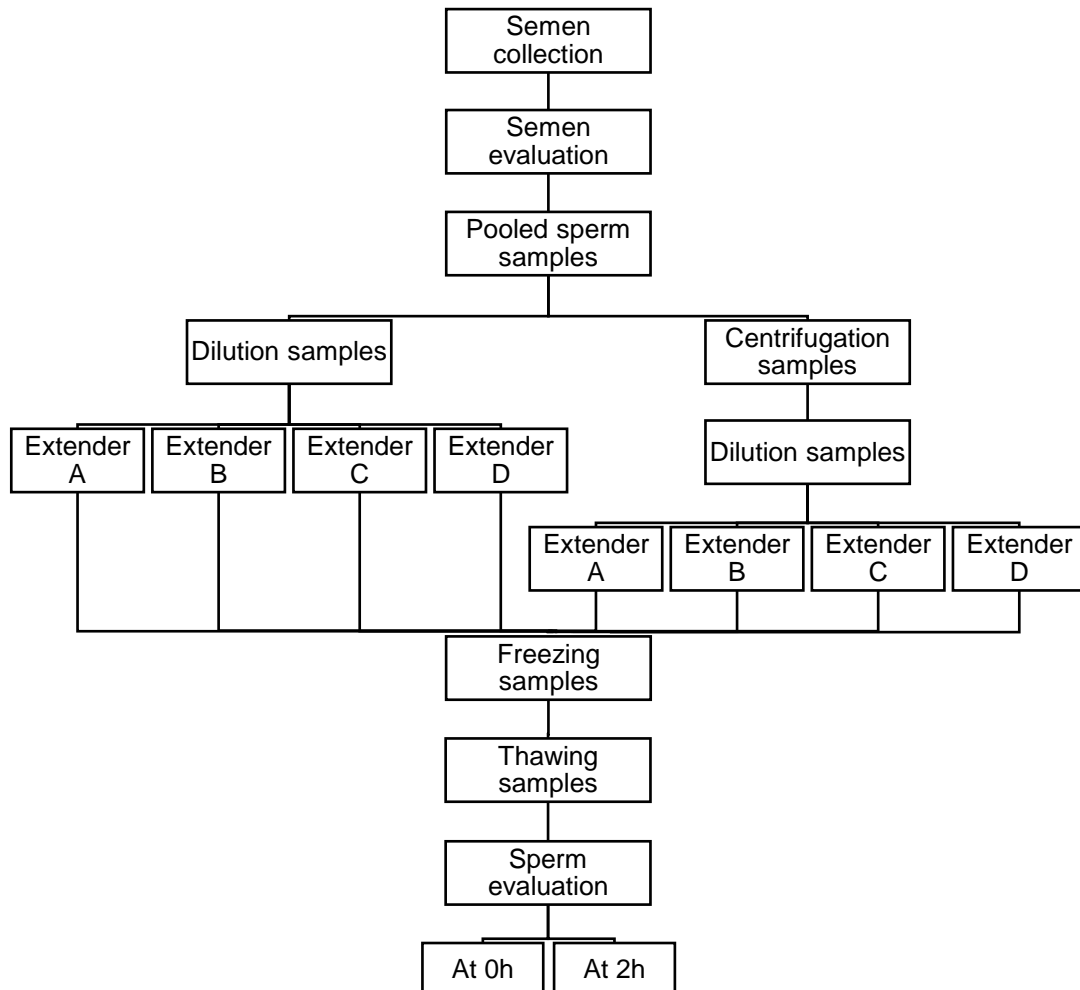


Figure 2. Percentage of vitality, HOS test and acrosome integrity of frozen rabbit sperm diluted with extender A, B, C and D. Data are mean \pm SEM. Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($p < 0.05$).

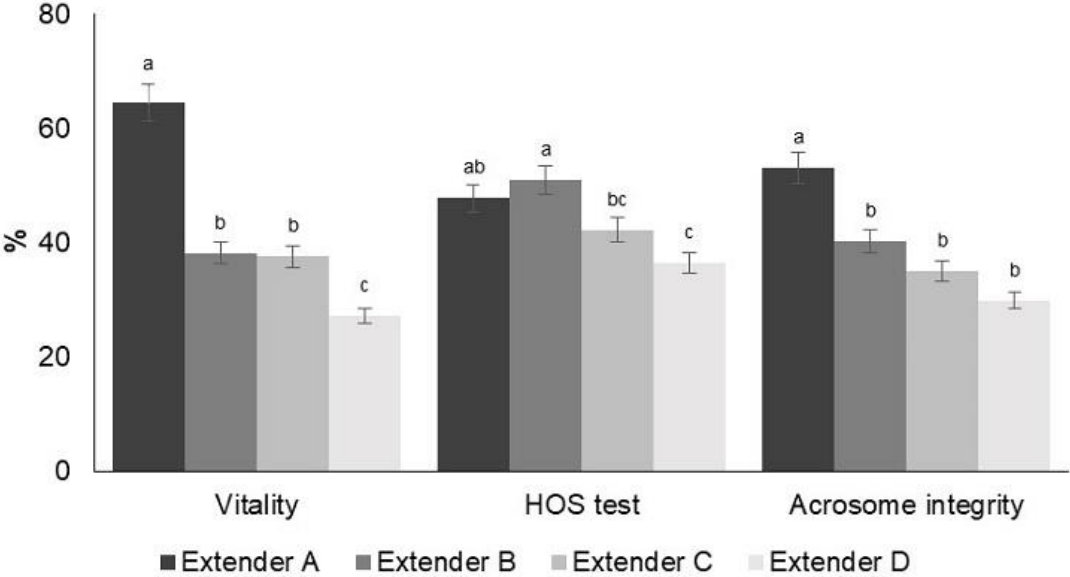
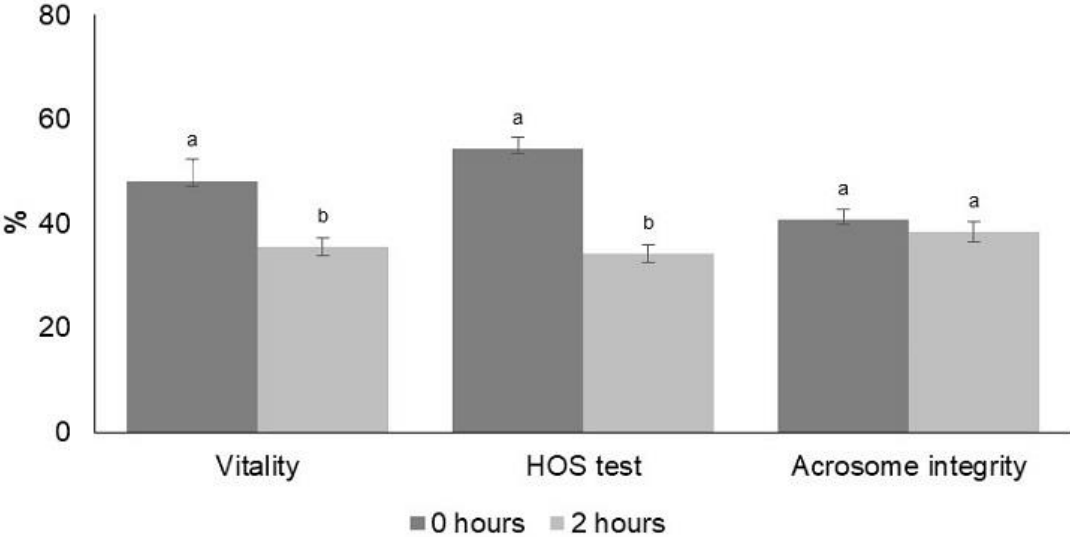


Figure 3. Percentage of vitality, HOS test and acrosome integrity of rabbit sperm analysed at 0 and 2 hours after thawing. Data are mean \pm SEM. Different letters within each diagnostic test denote statistical differences ($p < 0.05$).



X. TABLES

Table 1

Effect of extender A-D on kinematic parameters of freeze-thawed rabbit spermatozoa from SP and Non-SP groups.

	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
Extender A	38.5±2.0 ^a	48.6±2.2 ^a	17.8±0.6 ^a	29.2±1.1 ^a
Extender B	21.2±2.0 ^b	42.1±2.2 ^b	15.5±0.6 ^b	26.1±1.1 ^{ab}
Extender C	23.4±1.9 ^b	42.9±2.1 ^b	14.8±0.6 ^b	25.0±1.0 ^{bc}
Extender D	12.5±1.9 ^c	38.2±2.0 ^b	12.5±0.6 ^c	22.3±1.0 ^c
<i>p</i>	<0.001	0.008	<0.001	<0.001

	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Extender A	37.3±1.3 ^a	60.9±1.2 ^a	61.2±1.2 ^a	2.8±0.1 ^a	5.8±0.4 ^a
Extender B	37.9±1.3 ^a	60.0±1.2 ^a	62.9±1.2 ^a	2.5±0.1 ^{ab}	4.1±0.4 ^{ab}
Extender C	36.3±1.2 ^a	59.6±1.2 ^a	60.7±1.2 ^a	2.7±0.1 ^a	4.6±0.4 ^a
Extender D	36.5±1.2 ^a	56.9±1.1 ^a	62.9±1.2 ^a	2.2±0.1 ^b	2.9±0.4 ^b
<i>p</i>	0.781	0.092	0.405	0.012	<0.001

*Different letters within each column denote statistical differences ($P < 0.050$). Data are mean \pm SEM.

Table 2

Percentage of motile spermatozoa of post thaw rabbit sperm at 0 and 2 hours diluted with extender A, B, C and D from SP and Non-SP groups.

	Hours after thawing	MOT (%)
Extender A	0	52.9±2.8 ^a
	2	24.3±2.8 ^{bc}
Extender B	0	25.6±2.8 ^b
	2	16.8±2.8 ^c
Extender C	0	35.0±2.8 ^b
	2	11.9±2.7 ^d
Extender D	0	16.4±2.7 ^c
	2	8.7±2.7 ^e

*Different letters within each column denote statistical differences (P<0.050). Data are mean ± SEM.

Table 3

Effect of seminal plasma on freeze-thawed rabbit spermatozoa on MOT, vitality, HOS test and acrosome integrity parameters.

	MOT (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
Without SP	24.0±1.4	42.5±1.5	14.9±0.4	25.1±0.7	37.0±0.9	59.9±0.9
With SP	23.9±1.4	43.4±1.5	15.4±0.4	26.2±0.7	36.9±0.9	58.8±0.8
<i>p</i>	0.968	0.684	0.480	0.327	0.928	0.351

	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)	Vitality (%)	HOS test (%)	Acrosome integrity (%)
Without SP	61.6±0.9	2.6±0.1	4.5±0.3	42.7±1.5	43.7±1.6	41.6±2.8
With SP	62.4±0.9	2.6±0.1	4.3±0.3	40.9±1.5	45.2±1.7	36.1±2.9
<i>p</i>	0.519	0.984	0.687	0.387	0.479	0.230

* Data are mean ± SE.

Artículo 5

“Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents”

(*Cryobiology*. 81, 174-177, 2018)



Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents

Paula Domingo^{a,*}, Maite Olaciregui^a, Noelia González^a, Ignacio De Blas^b, Lydia Gil^a

^a Department of Animal Pathology, Obstetric and Reproduction Area, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain

^b Department of Animal Pathology, Animal Health Area, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA fragmentation
Freeze-drying
Halomax
Rabbit sperm
Rosmarinic acid

ABSTRACT

Freeze-drying (FD) technique has been applied as an alternative technology to preserve gene resources to allow simple sperm preservation and shipment at 4 °C. Nevertheless, DNA sperm might be damaged by mechanical or oxidative stress throughout FD procedure. Therefore, suitable protection to maintain DNA integrity is required. The aim of this study was to determine the effect of rosmarinic acid (RA) as an antioxidant and two chelating agents (EGTA and EDTA) on the DNA integrity of freeze-dried rabbit sperm after storage of the samples at 4 °C and room temperature for 8 months. Rabbit sperm were freeze-dried in basic medium (10 mM Tris-HCl buffer and 50 mM NaCl) supplemented with 50 mM EGTA (1), 50 mM EGTA plus 105 μM RA (2), 50 mM EDTA (3) or 50 mM EDTA plus 105 μM RA (4). Semen samples were kept at 4 °C and room temperature during 8 months. After rehydration, DNA integrity was evaluated with Sperm Chromatin Dispersion test observing that DNA fragmentation was higher when semen samples were freeze-dried with EGTA (10.9%) than with EDTA (4.1%) ($p < 0.01$). Furthermore, RA acted better under adverse conditions and no significant differences were found in temperature storage. Summarizing, FD is a method that can allow simple gene resources preservation among 4 °C to 25 °C during 8 months and transportation without the need for liquid nitrogen or dry ice. EDTA chelating agent is the most suitable media for freeze-dried rabbit sperm and the addition of RA protects the DNA against the oxidative stress caused during FD procedure.

1. Introduction

Assisted Reproductive Technologies in mammals has been steadily progressing. Freeze-drying (FD) procedure, or lyophilisation, has been applied as an alternative technology to preserve gene resources [7–11,13,24]. The feasibility of this method is owing to the evidence that freeze-dried spermatozoa allows viable offspring by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in rabbits [15], mice [5,7,13,14,24,25], rats [3,4] and horses [1]. In addition, FD technology allows simple sperm preservation and shipment at 4 °C without noticeable deterioration, meaning that neither liquid nitrogen nor dry ice is required [4,7]. Room temperature would be ideal for long-term freeze-dried sperm storage and shipment.

Nevertheless, sperm DNA might be damaged by mechanical or oxidative stress throughout FD procedure [13,14]. It is suggested that Ca²⁺ and Mg²⁺ divalent cations activate sperm endogenous nucleases from plasma membrane during FD procedure causing DNA sperm damage and chromosome aberrations [13,21]. Previous studies in mice have reported that chelating agents such as ethylene glycol-bis(2-

aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) or 2,2',2''-(ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetic acid (EDTA) added to freeze-drying medium can be combined with divalent cations forming stable complexes and thus protect DNA sperm from degradation [5,13,14]. Additionally, oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) were previously associated with DNA sperm degeneration [13,14]. Rosmarinic acid (RA) is a natural antioxidant [20] that has shown therapeutic effects against oxidative stress in in vitro cell studies [12]. It has been demonstrated that the incorporation of RA in freezing [16,26] and FD [18] medium provides protection on spermatozoa against oxidative stress and thus improves the quality of sperm preservation.

To our knowledge, no studies have been performed to evaluate the effect of antioxidants on freeze-dried rabbit sperm.

The aim of this study was to determine the effect of RA as an antioxidant and two chelating agents (EGTA and EDTA) on the DNA integrity of freeze-dried rabbit sperm after storage at 4 °C and room temperature for 8 months. In addition, the influence of the storage temperature also was evaluated.

* Corresponding author.

E-mail address: paula.domingo.tomas@gmail.com (P. Domingo).

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.004>

Received 28 November 2017; Received in revised form 16 January 2018; Accepted 17 January 2018

Available online 31 January 2018

0011-2240/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and media

Unless noted otherwise, all chemicals were from Sigma-Aldrich Co. (Alcobendas, Madrid, Spain). Freeze-drying control media used were: EGTA and EDTA. EGTA medium was composed of basic medium (10 mM Tris-HCL buffer and 50 mM NaCl) supplemented with 50 mM EGTA and EDTA medium was composed of basic medium (10 mM Tris-HCL buffer and 50 mM NaCl) supplemented with 50 mM EDTA. Two more experimental FD media were prepared by adding 105 μ M RA to EGTA (EGTA-RA) and EDTA (EDTA-RA) [16]. The final pH of the solutions were adjusted to between 8.2 and 8.5 [9].

2.2. Animals

The study was performed following approval by the Veterinary Ethical Committee of University of Zaragoza. The care and use of animals were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

All semen samples were collected from eight sexually mature bucks previously selected from at a commercial AI centre (Técnicas Cuniólicas S.A.). Males were maintained in individual cages under light cycle of 12 h light/dark at a room temperature of 22–24 °C and a relative humidity of 55–60%. All animals were fed a commercial pellet diet according to their reproductive condition and fresh water was given *ad libitum*.

2.3. Collection of rabbit spermatozoa

Rabbit sperm samples were collected by artificial vagina. After semen collection, any gel plug was removed. Immediately a macroscopic analysis was performed to assess the colour and the volume of each ejaculate and the motility was evaluated by integrated sperm analysis system (ISAS[®]; PROISER R + D, Valencia, Spain). Only ejaculates with white colour, > 0.2 mL and good wave motion (at least 85% of motility) were used for the research. Thereafter all ejaculates were pooled, in order to eliminate individual differences, and diluted in pre-warmed (37 °C) INRA 96[®] (IMV Technologies, L'Aigle, France).

2.4. Freeze-drying and rehydration procedures

Freeze-drying procedure was performed as reported by Wakayama and Yanagimachi (1998) [24]. Heterospermic solution was divided into four falcon tubes for centrifuge at 700 g for 10 min at 37 °C and the supernatant was discarded. Afterwards, each falcon tube was re-suspended in four FD media, EGTA, EGTA-RA, EDTA and EDTA-RA. 150 μ L of sperm suspension from each group were placed into 1 mL

volume glass cryovials (Labcon North, America, USA) and then plunged into liquid nitrogen (LN₂) for 5 min. Immediately the frozen samples were transferred onto the shelf (–50 °C) of a programmable freeze-drier (Lyobeta 25, Telstar). Two drying phases were performed for freeze-dry the samples: a primary drying at 0.053 mbar of pressure and at –68 °C and a second drying at 0.018 mbar of pressure and 20 °C of temperature. After FD process, cryovials were sealed with rubber cups and parafilm. Dried samples were stored in a conventional glass desiccator at 4 °C and room temperature (25 °C) during 8 months.

The rehydration of freeze-dried spermatozoa was performed by adding 300 μ L of Milli-Q water. Rehydrated spermatozoa were centrifuged once at 1000g during 2 min and the supernatant was removed. The pellet was resuspended in 500 μ L phosphate buffered saline (PBS) and thereafter the analysis of DNA integrity was performed by Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (Halotech DNA SL, Madrid, Spain).

2.5. Sperm DNA fragmentation analysis

Sperm Chromatin Dispersion test specifically designed for ocytolagus cuniculus spermatozoa (O.cuniculus-Halomax[®] kit) was used to evaluate sperm DNA fragmentation from freeze-dried spermatozoa. Succinctly, following the manufacturer's instructions, 25 μ L of each diluted sperm sample was gently mixed with 50 μ L of low melting point agarose. Subsequently, 2 μ L of the cell suspension was placed onto marked wells and each drop was covered with 24 × 24 mm glass coverslip. The slides were kept horizontally at 4 °C for 5 min to solidify the agarose. Then coverslips were removed and the slides were fully immersed horizontally in 10 mL of lysis solution for 5 min. After washing the samples in distilled water for 5 min, the slides were dehydrated through two successive ethanol baths (70% and 100%) for 2 min in each one and air-dried. Finally, the cells were stained using a green fluorescence microscopy staining kit (FluoGreen[®], Halotech DNA SL, Madrid, Spain). Once reagent A was mixed with reagent B in a 1:1 proportion, 3 μ L of the mix was placed over the slide and was covered with a coverslip. The slides were checked under fluorescence microscopy (Olympus BX-40, Olympus U-RFL-T, Tokyo, Japan) at magnification 400× and at least 400 spermatozoa were counted per semen sample.

2.6. Statistical tests

The study was replicated three times. Data were analysed using IBM SPSS Statistics 23 for Windows. DNA fragmentation data were expressed in percentages and analysed by chi-squared test. The level of significance was set at $p < .050$.

3. Results

The different halo patterns of sperm DNA fragmentation after FD procedure analysed by SCD test are shown in Fig. 1. Spermatozoa with

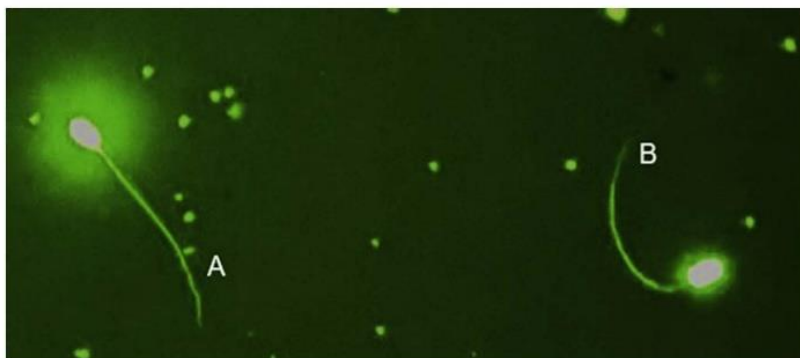


Fig. 1. Freeze-dried rabbit sperm processed with Sperm Chromatin Dispersion test. Fragmented sperm (A) and non-fragmented sperm (B).

Table 1

Effect of freeze-drying medium, rosmarinic acid and storage temperature on DNA integrity of lyophilized rabbit sperm. Different letters denote statistical differences ($p < .050$).

Freeze-drying medium	Rosmarinic acid	4 °C	25 °C
EDTA	–	3.7 ^a	4.7 ^a
	+	4.1 ^a	4.2 ^a
EGTA	–	11.1 ^{bc}	12.5 ^c
	+	10.6 ^{bc}	9.5 ^b

fragmented DNA reflected a large and spotty halo of chromatin dispersion unlike non-fragmented DNA spermatozoa which presented a small and compacted halo.

The data obtained after analysed the DNA damaged of freeze-dried rabbit sperm treated in different ways and stored during 8 months at 4 °C and room temperature are shown in Table 1. Freeze-dried sperm samples treated with EDTA showed a lower percentage of sperm with fragmented DNA (4.1%) than EGTA sperm samples (10.9%) ($p < .001$). In fact, EGTA sperm samples stored at 25 °C were the most damaged DNA spermatozoa observed, although when RA was added to EGTA freeze-dried medium before FD and stored at 25 °C the percentage of spermatozoa with intact DNA increased significantly ($p = .019$). However no significant differences were found in storage EDTA sperm samples at 4 °C or 25 °C not even when were supplemented with RA.

4. Discussion

Freeze-drying procedure has been applied as an alternative reproductive technology to preserve animal gene resources and increase the biobank genetic diversity [7,10].

Several previous studies have attempted to improve FD method in order to achieve viable animals offspring [1,3–5,7,13–15,24]. Interestingly, some studies demonstrated that Ca^{2+} and Mg^{2+} divalent cations were responsible for DNA sperm damage and chromosome aberrations [13,21] and moreover, chelating agents such as EGTA or EDTA added to FD medium can be combined with divalent cations forming stable complexes and thus protect sperm DNA from degradation [5,13,14]. The present study has demonstrated for the first time that EDTA chelating agent added to FD medium protect rabbit sperm DNA better than EGTA during FD process. This observation is in agreement with Olaciregui et al. [19] who reported that EDTA and EGTA have different chelating actions although, unlike our results, Olaciregui et al. [19] determined that EGTA is a greater chelating agent than EDTA in freeze-dried dog sperm. Similarly, Nakai et al. [17] reported that EGTA is more suitable than EDTA for adding to FD buffer for boar sperm since EGTA improves in vitro developmental ability of injected oocytes to the blastocyst stage. The only research performed in freeze-dried rabbit sperm used EGTA as FD medium but was not been compared with other chelating agent [15].

In contrast, Kaneko and Nakagata [5] have shown that EDTA prevents sperm DNA degeneration more efficiently and at lower concentrations than EGTA during FD and preservation of mouse spermatozoa. Additionally, Gianaroli et al. [2] demonstrated that the process of FD by using EDTA chelating agent does not affect DNA integrity of human spermatozoa, the proportion of spermatozoa with fragmented DNA in fresh samples (77.8%) being similar to samples which were subjected to FD process (80.6%).

Comparing our findings in freeze-dried rabbit sperm with others in boar, dog, mouse and human sperm, we suggest that even though EDTA and EGTA are both great chelating agents, its effectivity depends on the concentration and the animal species which are used.

To our knowledge, there has not been any report about the influence of antioxidant supplementation on rabbit sperm preservation. As known, FD technique can disrupt the balance between the production of ROS and detoxification. The oxidative stress produced by the excess of

ROS leads to strand breaks, base modification and cross-linking of the DNA [22,23]. Zhang et al. [26] reported that the antioxidants could minimize the detrimental effect of ROS and improve the quality of spermatozoa. Besides, Luño et al. [16] showed that RA antioxidant provides a protection against oxidative stress during boar sperm cryopreservation and likewise, Olaciregui et al. [18] observed that the addition of RA to EGTA FD medium decreases significantly ($p = .003$) the percentage of DNA damage in freeze-dried ovine spermatozoa. Lastly, Kodama et al. [12] demonstrated that antioxidant treatment in humans with high level of oxidative sperm DNA damage may reduce the extensive oxidative DNA damage. In this study, the addition of RA antioxidant to FD medium reduced the percentage of fragmented freeze-dried rabbit spermatozoa. To highlight, RA exerted greater protection when samples underwent high degree of oxidative stress. EGTA samples stored at 25 °C showed the higher percentage of fragmented DNA (12.5%), despite this the supplementation of RA decreased significantly ($p = .019$) the percentage of fragmented spermatozoa (9.5%). Under good conditions the effect of RA was not noted. EDTA samples stored at 4 °C exhibited a lower percentage of fragmented spermatozoa (3.7%), however the addition of RA increased the DNA damage (4.1%). On the other hand, EDTA samples stored at 25 °C showed higher percentage of fragmented DNA (4.7%) than samples stored at 4 °C but in this case, the supplementation with RA decreased the percentage of fragmented DNA (4.2%). These results suggest that the addition of RA to FD medium decrease the damage of DNA when samples undergo high degree of oxidative stress. When EDTA FD medium is used, the balance between the amount of ROS and detoxification is compensated by the chelating agent and RA may interfere in its action. It should be noted that in the study of Olaciregui et al. [18] in freeze-dried ovine spermatozoa, the percentage of fragmented DNA in EGTA (4.4%) and EGTA-RA (2.9%) was lower than our results, concluding that RA is more efficient when samples are diluted with EGTA and that DNA of rabbit spermatozoa diluted with EGTA is more sensitive to FD process than the ovine equivalent.

Regardless of no significant differences being found after storage of EDTA or EGTA rabbit sperm samples at 4 °C or 25 °C, not even when were supplemented with RA, data showed that sperm samples stored at 4 °C had little less damage to the DNA. Other authors have reported previously, in other animals such as mouse [6,24], rats [4] and dogs [19], that the most suitable temperature to keep freeze-dried sperm is 4 °C. In this way, FD method offers many advantages over cryopreservation at -196 °C where a constant supply of liquid nitrogen is required. This study is a breakthrough because it shows that it is possible to preserve gene resource during 8 months at room temperature making the transport of the samples over the world easier and cheaper.

Finally it is interesting to highlight that to date, there has not been any report about the influence of antioxidant supplementation on freeze-dried rabbit spermatozoa. Therefore, freeze-drying is a method that can allow simple gene resources preservation among 4 °C to 25 °C and transportation without the need for liquid nitrogen or dry ice. Unlike other animals [17–19], EDTA chelating agent is the most suitable media for FD rabbit sperm under the conditions employed here and the addition of RA can protect the DNA against the oxidative stress caused during FD procedure.

Authors' contributions

All authors are aware of the submission and agree to be listed as co-authors. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

None of the authors declare competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Miguel Domingo, chief of Técnicas Cunicolas S.A. farm, for the assistance in the fieldwork. This study was supported by Government of Aragon Research Groups (Fondo Social Europeo, DGA) and IA2.

References

- [1] Y.H. Choi, D.D. Varner, C.C. Love, D.L. Hartman, K. Hinrichs, Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the 321 horse, *Reproduction* 142 (2011) 529–538.
- [2] L. Gianaroli, M.C. Magli, I. Stanghellini, A. Crippa, A.M. Crivello, et al., DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa, *Fertil. Steril.* 97 (5) (2012) 1067–1073.
- [3] M. Hirabayashi, M. Kato, J. Ito, S. Hoshi, Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads, *Zygote* 13 (2005) 79–85.
- [4] S. Hoshi, K. Watanabe, M. Kato, M. Hirabayashi, Live rats resulting from micro-injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year, *Mol. Reprod. Dev.* 70 (2008) 1776–1781.
- [5] T. Kaneko, N. Nakagata, Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent, *Cryobiology* 53 (2006) 279–282.
- [6] T. Kaneko, N. Nakagata, Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa, *Comp. Med.* 55 (2005) 140–144.
- [7] T. Kaneko, T. Serikawa, Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa, *Cryobiology* 64 (2012) 211–214.
- [8] T. Kaneko, D.G. Whittingham, J.W. Overstreet, R. Yanagimachi, Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status, *Biol. Reprod.* 69 (2003) 1859–1862.
- [9] T. Kaneko, D.G. Whittingham, R. Yanagimachi, Effect of pH value of freeze drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa, *Biol. Reprod.* 68 (2003) 136–139.
- [10] T. Kaneko, Sperm freeze-drying and micro-insemination for biobanking and maintenance of genetic diversity in mammals, *Reprod. Fertil. Dev.* 28 (8) (2016) 1079–1087.
- [11] Y. Kawase, H. Suzuki, A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm, *J. Reprod. Dev.* 57 (2) (2011) 176–182.
- [12] H. Kodama, R. Yamaguchi, J. Fukuda, H. Kasai, T. Tanaka, Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients, *Fertil. Steril.* 68 (1997) 519–524.
- [13] H. Kusakabe, M.A. Szczygiel, D.G. Whittingham, R. Yanagimachi, Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 13501–13506.
- [14] H. Kusakabe, R. Yanagimachi, Y. Kamiguchi, Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes, *Hum. Reprod.* 23 (2008) 233–237.
- [15] J.L. Liu, H. Kusakabe, C. Chang, H. Suzuk, D.W. Schmidt, M. Julian, R. Pfeffer, C. Bormann, X.C. Tian, R. Yanagimachi, X. Yang, Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits, *Biol. Reprod.* 70 (2004) 1776–1781.
- [16] V. Luño, L. Gil, M. Olaciregui, N. González, R.A. Jerez, et al., Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation, *Cryobiology* 69 (1) (2014) 157–162.
- [17] M. Nakai, N. Kashiwazaki, A. Takizawa, N. Maedomari, M. Ozawa, J. Noguchi, H. Kaneko, M. Shino, K. Kikuchi, Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection, *Zygote* 15 (2007) 15–24.
- [18] M. Olaciregui, V. Luño, P. Domingo, N. González, L. Gil, In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1096 24.
- [19] M. Olaciregui, V. Luño, N. Gonzalez, I. De Blas, L. Gil, Freeze-dried dog sperm: dynamics of DNA integrity, *Cryobiology* 71 (2) (2015) 286–290.
- [20] P. Pereira, D. Tysca, P. Oliveira, L.F. da Silva Brum, J.N. Picada, et al., Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid, *Pharmacol. Res.* 52 (2005) 199–203.
- [21] B. Sotolongo, T.T. Huang, E. Isenberger, W.S. Ward, An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments, *J. Androl.* 26 (2005) 272–280.
- [22] G.W. Teebor, R.J. Boorstein, J. Cadet, The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (2) (1988) 131–150.
- [23] J.P. Twigg, D.S. Irvine, R.J. Aitken, Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection, *Hum. Reprod.* 13 (7) (1998) 1864–1871.
- [24] T. Wakayama, R. Yanagimachi, Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 639–641.
- [25] M.A. Ward, T. Kaneko, H. Kusakabe, J.D. Biggers, D.G. Whittingham, et al., Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection, *Biol. Reprod.* 69 (6) (2003) 2100–2108.
- [26] W. Zhang, K. Yi, C. Chen, X. Hou, X. Zhou, Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.* 132 (3–4) (2012) 123–128.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La adición de DMF al diluyente base de refrigeración INRA 96[®] ejerce un efecto protector sobre la membrana de los espermatozoides mejorando la calidad de los mismos durante un período de refrigeración de 72 horas.
2. El mantenimiento del PS durante la refrigeración espermática ejerce un efecto protector sobre las membranas de los espermatozoides y mejora los parámetros cinéticos.
3. En la congelación espermática la eliminación previa del PS no mejora la calidad de los espermatozoides tras la descongelación, siendo innecesaria su eliminación.
4. El diluyente BotuCrio[®] representa una alternativa en la congelación seminal en la especie cunícola.
5. El agente quelante EDTA preserva más eficientemente la integridad del ADN de los espermatozoides de conejo liofilizados y además, la adición de ácido rosmarínico en el medio de liofilización disminuye el porcentaje de ADN fragmentado.
6. Los espermatozoides de conejo liofilizados pueden conservarse tanto a 4°C como a temperatura ambiente, ofreciendo similares porcentajes de ADN fragmentado tras su rehidratación.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The addition of DMF to INRA 96[®] diluent exerts a protective effect on the membrane of spermatozoa, enhancing seminal quality of cooled rabbit sperm stored during 72 hours.
2. Seminal plasma exerts a protective effect on rabbit sperm membranes and improves sperm kinetics.
3. The elimination of seminal plasma in freeze-thawing protocol does not enhance sperm quality.
4. BotuCrio[®] is a good extender for using in freeze-thawing rabbit sperm procedure.
5. EDTA chelating agent maintains greater DNA integrity of freeze-dried rabbit sperm and the addition of rosmarinic acid to freeze-drying media reduces the percentage of fragmented DNA.
6. Freeze-dried rabbit sperm can be preserved at 4°C and room temperature, providing a similar percentage of fragmented DNA after rehydration.

RESUMEN

La inseminación artificial (IA) con semen refrigerado es la práctica más común en las explotaciones cunícolas, por lo que cualquier mejora en la misma ayudaría a aumentar significativamente su eficiencia. Por otro lado, la congelación espermática en cunicultura es un método utilizado únicamente en investigación o para la preservación de especies en peligro de extinción, debido a la baja tasa de supervivencia espermática tras la descongelación seminal. De este modo, una mejora en la técnica de congelación facilitaría el almacenamiento de recursos genéticos y el transporte de material genético sin la necesidad de transportar animales vivos. Por último, la liofilización de espermatozoides es un método muy innovador que aún está en proceso de desarrollo. La puesta a punto de este método supondría un gran avance en la reproducción asistida, ya que facilitaría el almacenamiento de dosis seminales durante largos períodos de tiempo sin la necesidad de utilizar nitrógeno líquido (LN₂). Por todo ello, el principal objetivo de este trabajo fue investigar los diferentes puntos críticos de los procesos de refrigeración, congelación y liofilización espermática con el fin de mejorar la preservación seminal en la especie cunícola.

El objetivo de la primera experiencia fue evaluar si el plasma seminal (PS) puede mejorar la calidad de los espermatozoides almacenados a 16°C durante 72 horas y también evaluar el efecto protector del glicerol, DMF y NMP. Las muestras seminales se homogeneizaron y dividieron en ocho fracciones. Una de ellas se diluyó con INRA 96[®] (diluyente A) y las otras tres con INRA 96[®] y un crioprotector (CP) al 6%: glicerol (diluyente B), DMF (diluyente C) o NMP (diluyente D). Las otras cuatro fracciones se centrifugaron y el sobrenadante se descartó para eliminar el PS. A continuación, cada muestra se resuspendió con el diluyente A, B, C o D, respectivamente. Todas las muestras se almacenaron a 16°C y se analizaron a las 4, 24, 48 y 72 horas mediante el sistema integrado de análisis de semen (ISAS[®]) y las pruebas de vitalidad, test hipoosmótico (HOS test) e integridad del acrosoma. Tras analizar los resultados, las muestras procesadas con PS mostraron un mayor porcentaje ($p=0.020$) de espermatozoides con la membrana plasmática sin dañar ($71,9\pm 1,6\%$) que las muestras procesadas sin PS ($66,5\pm 1,6\%$). Por otro lado, los espermatozoides sin PS obtuvieron mejores parámetros cinéticos. Los diluyentes A y C mostraron excelentes resultados en MOT ($63,1\pm 4,3\%$

diluyente A; $63.4 \pm 3.7\%$ diluyente C), vitalidad ($88.9 \pm 2.6\%$ diluyente A; $87.7 \pm 2.7\%$ diluyente C) y HOS test ($68.9 \pm 1.4\%$ diluyente A; $75.2 \pm 1.4\%$ diluyente C). Los peores resultados fueron obtenidos por los diluyentes B y D. Estos resultados sugieren que el PS ejerce una acción protectora en las membranas de los espermatozoides de los conejos y mantiene la MOT. La adición de glicerol y NMP a un diluyente de refrigeración base como INRA 96[®] no mejora la calidad del espermatozoide del conejo. Sin embargo, la DMF ejerce un efecto protector sobre la membrana de los espermatozoides mejorando la calidad seminal durante la preservación del espermatozoide del conejo a 16°C.

En la segunda experiencia se valoró el efecto de diferentes crioprotectores como el glicerol, DMF y NMP en espermatozoides de conejo refrigerados a dos temperaturas (16°C y 4°C) durante 72 horas. Las muestras seminales se dividieron en cuatro fracciones y se diluyeron con: INRA 96[®] (diluyente A) e INRA 96[®] con un CP al 6%: glicerol (diluyente B), DMF (diluyente C) o NMP (diluyente D). Posteriormente cada muestra se dividió en dos tubos eppendorf para ser almacenada cada muestra a 16°C y 4°C. Se analizaron a las 4, 24, 48 y 72 horas con el programa ISAS[®] y se realizaron las pruebas vitalidad, HOS test y la integridad del acrosoma. Como resultado, el diluyente C mostró una mayor MOT, vitalidad y HOS test que el extender B y D ($p < 0.050$). A pesar de que la calidad seminal disminuyó con el tiempo ($p < 0.050$), se observó que a las 24 horas de almacenamiento, las muestras procesadas con DMF mantuvieron una mayor MOT y de espermatozoides con la membrana plasmática sin dañar. Estos resultados sugieren que la adición de glicerol y NMP a INRA 96[®] no ofrece ventajas. Sin embargo, se ha demostrado que la adición de DMF a INRA 96[®] ejerce un efecto protector sobre la membrana de los espermatozoides mejorando la calidad seminal. La temperatura de almacenamiento entre 16°C y 4°C no afectó la calidad de los espermatozoides de los conejos.

El objetivo de la tercera experiencia fue encontrar un protocolo adecuado para mejorar la criopreservación de espermatozoides de conejo analizando el papel que desempeña el PS y diferentes CP sobre la calidad seminal en el momento de la descongelación y transcurridas 2 horas. Las muestras seminales se homogeneizaron y se dividieron en ocho fracciones. Una de ellas se diluyó con BotuCrio[®] (diluyente A) y las otras tres con INRA 96[®] más un CP al 6%: glicerol (diluyente B), DMF (diluyente C) o NMP (diluyente D). Las otras cuatro fracciones se centrifugaron y el sobrenadante se descartó para eliminar el PS. Luego, cada muestra se resuspendió con el diluyente A, B, C o D. Las muestras se enfriaron progresivamente, se cargaron en pajuelas de congelación de 0.5 ml y se

congelaron con vapores de LN₂. La descongelación se realizó colocando las pajuelas en un baño maría a 37°C durante 21 segundos. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf para su análisis mediante el programa ISAS[®], y se realizaron las pruebas de vitalidad, HOS test e integridad del acrosoma. Los mejores resultados de MOT y parámetros cinéticos fueron obtenidos por diluyente A ($p < 0.050$), incluso cuando se comparó la MOT con estudios previos utilizando otros diluyentes. La calidad de los espermatozoides disminuyó a las 2 horas de su descongelación ($p < 0.050$) y no se encontraron diferencias significativas entre las muestras procesadas con o sin PS. Esta experiencia revela que el BotuCrio[®] podría usarse para la criopreservación de espermatozoides de conejos y, además, que la eliminación del PS durante el proceso de congelación seminal no es necesaria, facilitando y reduciendo el tiempo de procesado de las muestras.

En la cuarta experiencia se intentaron mejorar las condiciones de almacenamiento de muestras de semen liofilizadas añadiendo al medio de liofilización diferentes agentes quelantes como EDTA y EGTA y un antioxidante (ácido rosmarínico). La liofilización se ha aplicado como una tecnología alternativa para preservar recursos genéticos durante largos períodos de tiempo y permitir el envío de espermatozoides a 4°C entre largas distancias. Sin embargo, el ADN de los espermatozoides puede dañarse debido al estrés mecánico u oxidativo al que son sometidos durante la liofilización. Para llevar a cabo esta experiencia los espermatozoides de conejo se liofilizaron en medio básico (tampón Tris-HCl 10 mM y NaCl 50 mM) suplementado con EGTA 50 mM (EGTA), EGTA 50 mM más ácido rosmarínico 105 µM (EGTA-RA), EDTA 50 mM (EDTA) o EDTA 50 mM más 105 µM ácido rosmarínico (EDTA-RA). Las muestras de semen se mantuvieron a 4°C y temperatura ambiente durante 8 meses. Tras la rehidratación, la integridad del ADN se evaluó con el test de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCDt) observando que la fragmentación del ADN era mayor cuando las muestras de semen se liofilizaban con EGTA (10.9%) en vez de EDTA (4.1%) ($p < 0.001$). Además, el ácido rosmarínico actuó mejor en condiciones adversas y no se encontraron diferencias significativas en el almacenamiento a temperatura ambiente. Por ello, la liofilización es un método que puede permitir la conservación de recursos genéticos entre 4 y 25°C durante 8 meses y transportarlos sin la necesidad de LN₂ o hielo seco. El agente quelante EDTA es el medio de liofilización más adecuado para preservar semen de conejo liofilizado y la adición de ácido rosmarínico protege el ADN contra el estrés oxidativo causado durante la liofilización.

SUMMARY

SUMMARY

Artificial insemination with cooled semen is the most common practise in rabbit farms and any improvement in it helps to increase the efficiency of rabbit meat farms. On the other hand, the cryopreservation of rabbit sperm is a method only used for researching or preserving breeds on the verge of extinction, due to the low rate of sperm survival after thawing. In this way, an improvement of the cryopreservation process could make easier the storage of genetic resources and the transport of seminal doses instead of live animals. Finally, freeze-drying is a very innovative method that is still in development process. Tuning of this method would be a great advance in assisted reproduction, since it would facilitate the storage of seminal doses for long periods of time without the need to use liquid nitrogen (LN₂).

Therefore, the main objective of this research was to investigate the different critical points of sperm refrigeration, freeze-thawing and freeze-drying process in order to improve seminal preservation in the rabbit species.

The purpose of the first experiment was evaluate whether seminal plasma (PS) can improve sperm quality of rabbit spermatozoa stored at 16°C till 72 hours and moreover evaluate the cryoprotectant effect of glycerol, DMF and NMP. Semen samples were pooled and divided in eight fractions. Four of them were diluted with INRA 96[®] (extender A), INRA 96[®] with 6% glycerol (extender B) or 6% DMF (extender C) or 6% NMP (extender D) respectively. The other four fractions were centrifuged and the supernatant was removed in order to eliminate PS. Then each sample was resuspended with extender A, B, C and D respectively. All samples were stored at 16°C and were analysed at 4, 24, 48 and 72 hours by integrated sperm analysis system (ISAS[®]), vitality test, hypo-osmotic swelling test (HOS test) and acrosome integrity test. After analyse the results, samples with PS showed a significant higher percentage ($p=0.02$) on HOS test ($71.9\pm 1.6\%$) than non-PS samples ($66.5\pm 1.6\%$). Non-PS samples had better results on kinematic parameters. Extender A and C showed great results on MOT ($63.1\pm 4.3\%$ A; $63.4\pm 3.7\%$ C), vitality ($88.9\pm 2.6\%$ A; $87.7\pm 2.7\%$ C) and HOS test ($68.9\pm 1.4\%$ A; $75.2\pm 1.4\%$ C). Extender B and D showed the worst data on sperm quality. These results suggest that PS exerts a protective action on rabbit sperm membranes and kept sperm motility greater.

The addition of glycerol and NMP to INRA 96[®] do not improve rabbit sperm quality nevertheless, DMF exerts a protective effect on the membrane of spermatozoa improving seminal quality during rabbit sperm preservation at 16°C.

In the second experiment we evaluated the effect of different cryoprotectant agents (CP) as glycerol, DMF and NMP on cooled rabbit sperm stored at 4°C and 16°C during a long period of time. Sperm samples were diluted with INRA 96[®] (extender A), INRA 96[®] with 6% glycerol (extender B) or 6% DMF (extender C) or 6% NMP (extender D) respectively, were stored at 4°C and 16°C and analysed at 4, 24, 48 and 72 hours after refrigeration by ISAS[®], eosin-nigrosin stain (vitality), HOS test and acrosome integrity test. As a result, Extender C showed higher MOT, vitality and HOS test than extender B and D ($p < 0.050$). Whereas sperm quality decreased over time ($p < 0.050$), data showed that the addition of DMF kept MOT and sperm plasma membrane integrity after 24 hours of storage better than other diluents. These results suggest that the addition of glycerol and NMP to INRA 96[®] did not offer advantages. Nevertheless, it has been demonstrated that the addition of DMF to INRA 96[®] exerts a protective effect on the membrane of spermatozoa improving seminal quality. The temperature of storage among 4°C and 16°C did not affect the quality of rabbit sperm.

The aim of the third experiment was to find a suitable protocol to enhance frozen rabbit sperm preservation analysing the role that PS plays and the effect of different CP on sperm quality 0 and 2 hours after thawing. Sperm samples were pooled and divided in eight fractions. Four of them were diluted with BotuCrio[®] (extender A), INRA 96[®] plus 6% glycerol (extender B), 6% DMF (extender C) and 6% NMP (extender D) respectively. The other four fractions were centrifuged and the supernatant was discarded in order to eliminate the PS. Each sample was then resuspended with extender A, B, C and D, respectively. Samples were cooled progressively, loaded into 0.5 ml freezing straws and frozen with liquid nitrogen vapour. Thawing was performed by placing the straws into a bain-marie at 37°C for 21 seconds. Straws were dried and sperm samples placed into eppendorf tubes to be analysed by ISAS[®] software, vitality test, HOS test and acrosome integrity test. After the results, the highest data on MOT and velocity parameters was obtained by extender A ($p < 0.050$) even when MOT parameter was compared with previous studies using other diluents. Additionally, sperm quality decreased over incubation time ($p < 0.050$) and no differences were found in samples processed with or without PS. This research reveal that BotuCrio[®] could be used for rabbit sperm

cryopreservation and moreover the improvement of the cryopreservation process of rabbit sperm due to the demonstration that PS removing is not required.

In the fourth experiment we tried to improve storage conditions of freeze-dried sperm samples by adding different chelating agents and antioxidants to freeze-drying media. Freeze-drying technique has been applied as an alternative technology to preserve gene resources to allow simple sperm preservation and shipment at 4°C. Nevertheless, DNA sperm might be damaged by mechanical or oxidative stress throughout freeze-drying procedure. Therefore, to perform this experiment, rabbit sperm were freeze-dried in basic medium (10mM Tris-HCl buffer and 50mM NaCl) supplemented with 50 mM EGTA (EGTA), 50 mM EGTA plus 105 µM rosmarinic acid (EGTA-RA), 50 mM EDTA (EDTA) or 50 mM EDTA plus 105 µM rosmarinic acid (EDTA-RA). Semen samples were kept at 4°C and room temperature during 8 months. After rehydration, DNA integrity was evaluated with sperm chromatin dispersion test (SCDt) observing that DNA fragmentation was higher when semen samples were freeze-dried with EGTA (10.9%) than with EDTA (4.1%) ($p < 0.001$). Furthermore, rosmarinic acid acted better under adverse conditions and no significant differences were found in temperature storage. Summarizing, freeze-drying is a method that can allow simple gene resources preservation among 4°C to 25°C during 8 months and transportation without the need for LN₂ or dry ice. EDTA chelating agent is the most suitable media for freeze-dried rabbit sperm and the addition of rosmarinic acid protects the DNA against the oxidative stress caused during freeze-drying procedure.

BIBLIOGRAFÍA

Adams GP, Ratto MH. (2013) Ovulation-inducing factor in seminal plasma: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, 136, 148-156.

Aksoy M, Cankat Lechimcioglu N, Akman O. (2008) Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4°C or freezing. *World Rabbit Sci.*, 16, 1-6.

Alvariño MR. (1993) Control de la reproducción del conejo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.

Alvariño JMR. (2000) Reproductive performance of male rabbits. *World Rabbit Sci.*, 8(1A), 13-35.

Amorim EAM, Torres CCA, Graham JK, Amorim LS, Santos LVL. (2009) The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 111(2-4), 338-343.

Auricb JE, Ktibne JA, Hoppe H, Auricbz C. (1996) Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation, *Theriogenology*. 46791-46797.

Bernstein AD, Petropavlovsky VV. (1937). Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Byull Eksp Biol Med*, 3, 41-43.

Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra ACSD, Silva AR. (2011) Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63, 263-266.

Bialy G, Smith VR. (1957) Freeze-drying of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci*, 40, 739-745.

Biggers JD. (1991) Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *J Reprod Fertil*, 93, 173-86.

Bjorndahl L, Soderlund I, Kvist U. (2003) Evaluation of the one step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*, 18, 813-816.

Carluccio A, Robbe D, De Amicis I, Contri A, Tosi U, Russo F, Paoletti M. (2004) Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Sci*, 12, 65-79.

Castellini C, Lattaioli P, Moroni M, Minelli A. (2000) Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 63, 275-282.

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.

Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. (1999) In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39, 185-191.

Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K. (2011) Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the 321 horse. *Reprod*, 142, 529-538.

Curry MR, Redding BJ, Watson PF. (1995) Determination of water permeability coefficient and its activation energy for Rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32, 175-181.

Darin-Bennett A, White IG. (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14, 466-470.

Eng L, Oliphant G. (1979) Rabbit Sperm Reversible Decapacitation by Membrane Stabilization with a Highly Purified Glycoprotein from Seminal Plasma. *Biol of reprod*, 19, 1083-1094.

- Flosdorf EW, Mudd S. (1935) Procedure and apparatus for preservation in “lyophile” form of serum and other biological substances. *J Immunol*, 29, 389-425.
- Flosdorf EW, Kimball AC. (1939) Studies with H. Pertussis: Maintenance of Cultures in Phase I *J Bacteriol*, 35, 696-704.
- Fuller B, Paynter S. (2004) Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod BioMed Online*, 9(6), 680-691.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM (2008) Glycerol, Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod in Dom Anim*, 45(2), 214-220.
- García Campos A, Gil L, Malo C, Martínez F & de Blas I. (2014) Effect of different monodisaccharides on the freeze-dried boar spermatozoa: a preliminary study. *CryoLetters*, 35(4), 277-285.
- Gibb Z, Aitken RJ. (2016) The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International*, 2016, 1-8.
- Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. (1995) Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 53, 985-95.
- Gogol P. (1999) Cryopreservation of plasma-deprived rabbit semen. *Ann Anim Sci*, 26, 85-92.
- Graham LK. (1994) Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41 (5), 1151-1162.
- Hammerstedt RH. (1993) Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev*, 5(6), 675-90.

Hara H, Abdalla H, Morita H, Kuwayana M, Hirabayasi M & Hochi S. (2011) Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. *J Reprod Dev*, 57, 428-432.

Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Negrete RM, Soto MYG, García RAD. (2012) Effect of cryopreservation on viability and the acrosomal state of New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen. *Revista Salud Animal*, 34, 188-191.

Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S. (2005) Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote*, 13, 79-85.

Hochi S, K. Watanabe, M. Kato, M. Hirabayashi, Live rats resulting from microinjection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year, *Mol. Reprod. Dev.* 70 (2008) 1776–1781.

Holtz W, Foote RH. (1978) Composition of Rabbit Semen and the Origin of Several Constituents. *Biol. Reprod.*, 18, 286-292.

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.

Jennings T. (2002) Lyophilization: Introduction and basic principles. CRC Press, Florida.

Jeyendran RS, Vander-Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zanevld LJD. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. *J Reprod Fertil*, 70, 219-228.

Johinke D, de Graaf SP, Bathgate R. (2014) Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Anim Reprod Sci*, 147, 135-143.

Kaneko T, Nakagata N. (2005) Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comp Med*, 55, 140-144.

- Kaneko T, Nakagata N. (2006) Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology*, 53, 279-282.
- Kaneko T, Serikawa T. (2012) Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 64, 211-214.
- Kaneko T. (2014) Preservation of mammalian sperm by freeze-drying. *Cryobiology*, 69(3), 510.
- Keskintepe L, Eroglu A. (2015) Freeze-drying of mammalian sperm. *Methods Mol Biol*, 1257, 489-497.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. (2001) Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 98, 13501-13506.
- Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. (2008) Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod*, 23, 233-372.
- Lavara R, Mocé E, Vicente JS. (2003) Buenas prácticas en inseminación artificial I: Preparación de dosis seminales. “Los factores responsables de la variación de los resultados de fertilidad y prolificidad de la IA”. *Boletín de cunicultura*, 127, 14-23.
- Lewis WH, Gregory PW. (1929) Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 69(1782), 226-229.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang C, Suzuk H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann C, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. (2004) Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 70, 1776-1781.
- Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva AR. (2009) Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 72, 650-654.

López FJ, Alvariño JMR. (1998) Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours. *World Rabbit Sci*, 6(2), 251-253.

López FJ, Alvariño JMR. (2000) Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Anim Reprod Sci*, 58, 147-154.

Luño V, Gil L, Olaciregui M, González N, Jerez RA, de Blas I. (2014) Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology*, 69(1), 157-162.

Maeda T, Liu E, Nishijima K, Tanaka M, Yamaguchi S, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, Kitajima S. (2012) Effect of the primary cooling rate on the mortality and fertility of frozen-thawed Rabbit spermatozoa. *World Rabbit Sci*, 20, 65-70.

Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F, García A, Jerez RA (2009). Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrologia*, 44(1), 605-610.

Martínez-Pastor F, Anel L, Guerra C, Álvarez M, Soler AJ, Garde J, Chamorro C, de Paz P. (2006) Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*, 66, 1847-1856.

Martins CF, Bão SN, Dodea MN, Correa GA, Rumpf R. (2007) Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology*, 67, 1307-1315.

Men NT, Kikuchi K, Nakai N, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Linh NV, Nguyen BS, Nagai T & Tajima A. (2013) Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 80, 1033-1044.

Mocé E, Vicente JS. (2009) Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim Reprod Sci*, 110, 1-24.

Moore AI, Squires EL, Graham JK. (2005) Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63, 2372-2381.

Mota Filhoa AC, Telesa CHA, Jucáa RP, Cardosob JFS, Uchoaa DC, Campello CC, Silvad AR, Silvaa LDM. (2011) Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology*, 76, 1367-1372.

Olaciregui M, Gil L, Montón A, Luño V, Jerez RA, Martí JI. (2014) Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*, 68, 91-95.

Olaciregui M, Luño V, Gonzalez N, De Blas I, Gil L. (2015) Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology*, 71(2), 286-90.

Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L. (2017) In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Sci Rep*, 24(7:1) 1096.

Pereira P, Tysca D, Oliveira P, da Silva Brum LF, Picada JN. (2005) Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res*, 52, 199-203.

Pincus G, Enzmann EV. (1934) Can Mammalian Eggs Undergo Normal Development in Vitro? *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 20(2), 121-2.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 164, 666-667.

Pukazhenthii BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, da Silva MC, Alvarenga MA, Wildt DE. (2014) Improved sperm cryosurvival in extenders containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology*, 68, 205-214.

Pursel V, Johnson L. (1974) Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1, 63-68.

Ramirez JS, Cañizares J. (2003) Deshidratación de la papa mediante liofilización atmosférica. Universidad Central Del Ecuador, Escuela de Ingeniería Química, Ecuador.

Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich WJ & Jewgenow K. (2011) Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reprod Fertil Dev*, 23, 818-825.

Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA. (2000) Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci*, 64, 103-112.

Sahni KL, Mohan G. (1990) Effect of removal of plasma on preservation of bovine semen. *Indian J Anim Sci*, 60 (7), 783-785.

Sanchez-Partida LG, Simerly CR & Ramalho-Santos J. (2008) Freeze-dried primate sperm retains early reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 89, 742-745.

Sarıözkan S, Özdamar S, Türk G, Cantürk F, Yay A. (2014) In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology*, 68, 349-353.

Setchell BP. (1989) Male reproductive organs and semen. In: *Reproduction in domestic animals*, 5th edition. Ed. H.H. Cole and P.T. Cupps. Academic Press. pp 229-256.

Sherman JK. (1954) Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 5, 357-371.

Silva M, Nino A, Guerra M, Letelier C, Valderrama XP, Adams GP, Ratto MH. (2011) Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits? *Anim Reprod Sci*, 127, 213-221.

Sinkovicks G, Medgyes I, Paljak J. (1983) Some results of artificial insemination in rabbits. *J Applied Rabbit Research*, 6, 43-48.

Sotolongo B, Huang TT, Isenberger E, Ward WS. (2005) An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl*, 26, 272-280.

Spallanzani L. (1776) Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermatici dell'hommo degli animali. Opuscoli di Fisica Animali e Vegetabile, II.

Trejo CA, Meza VVM, Antonio EC, Cotera RJ, Antonio-Cisneros CM. (2013) Coconut water (*Cocos Nucifera*) as a diluent for rabbit fresh semen in artificial insemination. *Arch Zootec*, 62, 299-302.

Troedsson MH, Desvovsuges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC. (2005) Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*, 89(1-4), 171-186.

Waberski D, Döhring A, Ardón F, Ritter N, Zerbe H, Schuberth HJ, Hewicker-Trautwein M, Weitze KF, Hunter RHF. (2006) Physiological routes from intra-uterine seminal contents to advancement of ovulation. *Acta Vet Scand*, 48, 1-8.

Wakayama T, Yanagimachi R. (1998) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*, 16, 639-641.

Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R. (2003) Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod*, 69(6), 2100-2108.

Watanabe H, Asano T, Abe Y, Fukui Y, Suzuki H. (2009) Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet*, 26, 531-536.

WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. (2010) 5th Ed. Geneva: World Health Organization. pp 26-32.

Zhang W, Yi K, Chen C, Hou X, Zhou X. (2012) Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 132(3-4), 123-128.

APÉNDICE

Carta de aceptación del artículo pendiente de publicación

Ref.: Ms. No. CJAS-D-18-00053R2

Comparison of different semen extenders and cryoprotectant agents to enhance the cryopreservation of rabbit spermatozoa

Czech Journal of Animal Science

Dear Dr. Domingo,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Czech Journal of Animal Science.

It was accepted on Sep 14, 2018

You will hear in due course from the Editor regarding the manuscript handling fee. Please notice that your paper will not be edited and will not proceed to publication before the payment.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Eva Tumova

Editor-in-Chief

Czech Journal of Animal Science

Factor de impacto y áreas temáticas de las revistas

Revista	Factor de impacto (JCR)	Quartile	Área temática
Cryobiology	2.050	Q2	Biology
Experimental Animals	1.173	Q2	Veterinary Science
Czech Journal of Animal Science	0.955	Q3	Agriculture, Dairy & Animal Science
Animal Reproduction	0.999	Q2	Agriculture, Dairy & Animal Science

“The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams”

Eleanor Roosevelt