



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE VETERINARIA

Avances en conservación de semen y separación de espermatozoides X e Y en la especie canina.

Carmen Ródenas Barceló

2015

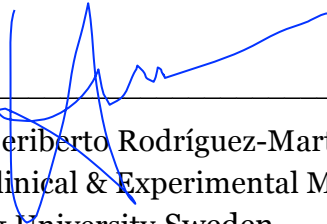
## To whom it may concern

I have reviewed the Thesis work performed by **Ms Carmen Ródenas Barceló** as part of her post-graduate studies at the University of Murcia, Dept of Animal Medicine and Surgery, in order to obtain the title of PhD. The thesis is entitled “**Advances in sperm preservation and sex pre-selection technology in canine species**” and focuses on the optimization of protocols for chilling and freezing/thawing of canine sperm, alongside the design of an effective protocol for their sorting for chromosomal sex using flow-cytometry. The thesis is of a coat-type built upon three articles published in international ranked journals with peer-review system, among which Ródenas Barceló is first author in all three. The coat contains an introduction, set of general objectives, and an extended summary (in English, respectively Castillian) including methodological considerations, experimental design and results followed by general conclusions, abbreviations and references. The thesis is comprehensive, providing a reasonable review of the literature, a proper hypothesis and a fully described methodological set-up. The results are clearly stated and a full, and interesting, discussion has been issued.

In her thesis, the candidate presents studies of a major topic in canine sperm cryobiology: is it possible to rapidly chill dog sperm as an alternative to customary slow cooling? Would this need alternate extenders? Could this render sperm viable even after longer storage periods? Would cryosurvival be higher if increased cooling rates (similar to when chilling spermatozoa) are applied? would this require other than customary (i.e. glicerol) cryoprotectants? Can sex-sorting be issued using conventional protocols developed for other species? Would fluorophore levels be similar? Would inter-male variation, classical in this species, blur the efficiency of sorting? Elegantly, the thesis covered these interrogants throughout the different studies. Interesting conclusions were provided, mostly of methodological importance (both chilling for liquid storage and chilling as part of cryopreservation can be issued at similar cooling rate, ameliorating protocols) as well as for biological consideration: sex-sorting can not disregard individual variation in this species, calling for deeper studies. The design of the different experiments was clearly presented, data were correctly analysed with pertinent statistical methods and results were clearly

presented and well-illustrated. The meanings and the implications of the results were clearly put in the context of the current literature and were correctly discussed paper by paper, reaching relevant conclusions, which were summarized in the coat.

This external reviewer considers the Doctoral Thesis entitled “Advances in sperm preservation and sex pre-selection technology in canine species” presented by Ms Carmen Ródenas Barceló under the research supervision of Proff Drs. Xiomara Lucas and Inmaculada Parrilla as best suited to undergo a public defense and evaluation by a jury to obtain the academic degree of Doctor by the University of Murcia with the mention of “International Doctorate”



---

Prof Dr Heriberto Rodríguez-Martínez  
Dept of Clinical & Experimental Medicine  
Linköping University, Sweden



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE  
ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

May 16, 2015

## TO WHOM IT MAY CONCERN

### Comprehensive evaluation of the Doctoral thesis of Carmen Ródenas Barceló “Advances in sperm preservation and sex preselection technology in canine species” as a whole

The main objectives of the thesis were to optimize the protocols for chilling and cryopreservation of dog spermatozoa and to adjust the standard sex-sorting procedures for canine spermatozoa.

The first study was aimed at evaluating the effect of different cooling rates from 23°C to 5°C on sperm quality of chilled and cold-stored dog spermatozoa using a 20% EY Tris fructose extender. For the first time a cooling rate of 2.25°C/min was tested without inducing any negative effect on viability, total and progressive motility compared with control (0.2°C/min). The results obtained are very interesting as they demonstrate the possibility of shortening the time required for the chilling procedure of dog semen from 1-2 h (traditional protocols) to 8 min with a positive impact on the practical point of view.

The second study tested the effect of a rapid cooling rate prior to freezing with Uppsala methods in combination with a fractionated or unfractionated glycerol addition protocol. The evaluation of plasma and acrosome integrity and motility parameters at 30 and 150 min post thawing suggest that dog spermatozoa could be cryopreserved using the Uppsala method at a rapid cooling rate (2.25°C/min) prior to freezing with addition of fractionated or unfractionated glycerol. These results bring useful information for the optimization of dog semen freezing procedure as it can be simplified by a more practical addition of unfractionated glycerol and by the use of a rapid cooling rate allowing a reduction of the time spent on the procedure.

In the third study the optimal Hoechst 33342 staining protocol for flow cytometric sex-sorting of dog spermatozoa was defined establishing the minimum effective Hoechst 33342 concentration, basic parameter for obtaining an optimal sorting output. The observation of the variability between males of the sortability of dog spermatozoa is of particular interest when selecting suitable dogs for inclusion in sex-sorting programs.



Overall the thesis is logically structured. The introduction communicates the central topic providing relevant literature background, the objectives are clear and the relevant methods described properly. Finally, the conclusions closely correspond to the raised objectives.

The three studies are published in three international peer reviewed journals.

The thesis reports new important information for canine semen storage and dog sperm sex-sorting that can significantly improve the application of these biotechnical procedures in dog.

For this reason I fully recommend this thesis for a doctoral degree and suitable examination.

Yours sincerely,

Prof. Marcella Spinaci

## *Tesis Doctoral por compendio de publicaciones*

1. **Quality of chilled and cold-stored (5°C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates.** Rodenas C, Parrilla I, Roca J, Martinez EA, Lucas X. Theriogenology 2014; 82, 621-626.
2. **Effects of rapid cooling prior to freezing on the quality of canine cryopreserved spermatozoa.** Rodenas C, Parrilla I, Roca J, Martinez EA, Lucas X. J Reprod Dev 2014; 60, 355-361.
3. **The effects of Hoechst 33342 staining and the male simple donor on the sorting efficiency of canine spermatozoa.** Rodenas C, Lucas X, Tarantini T, Del Olmo D, Roca J, Vazquez JM, Martínez E, Parrilla I., 2013. Reprod Domest Anim 2013; 49, 115-121.



*Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Universidad de Murcia y el*

*Grupo de Excelencia de la Fundación Séneca (04543/GERM/07)*





*Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria*  
*Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum"*

*Universidad de Murcia*



# Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral no sería una realidad sin la ayuda y apoyo de muchas personas que me han rodeado en estos últimos años. Ha sido una etapa que me ha hecho crecer mucho como persona, descubrir un mundo apasionante, así como realizar un trabajo del que me siento muy orgullosa.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de Tesis, la *Dra. Xiomara Lucas*, por ser mi gran ejemplo a seguir, por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de trabajar al lado de una grandísima profesional. Por ser tan positiva y darme ánimo cuando lo necesitaba, por su esfuerzo en corregir y dirigir este trabajo. Pero principalmente, porque conocerla fue la causa de que decidiera emprender esta aventura y de que cada día sienta más pasión por la reproducción canina. Creo que sabes lo mucho que te quiero y admiro y lo a gusto que trabajo codo con codo contigo todos los días, haciendo lo que más nos gusta.

En segundo lugar a mi directora de Tesis, la *Dra. Inmaculada Parrilla*, por su paciencia infinita durante todo este tiempo, por resolverme mis interminables dudas y las horas que hemos pasado juntas para poner a punto todos los protocolos. Para mi es de admiración su pasión y total entrega a la investigación. Pero sobre todo, por ser una grandísima profesional que ha dirigido y corregido meticulosamente, y con muchísimo cariño este trabajo.

Al *Dr. Emilio Martínez*, por ser mi “padre” en el mundo de la investigación. Porque hace unos años, cuando decidí emprender este camino, no dudó en abrirme las puertas al departamento prácticamente sin conocerme. Por haberse implicado de forma activa en la realización de este trabajo y por su cariño y apoyo incondicional.

Al *Dr. Jordi Roca*, por ser tan gran investigador como docente y transmitirme sus conocimientos. Por su cariño, sus sabios consejos y su gran interés porque terminara cuanto antes esta Tesis.

Al *Dr. Juan María Vázquez*, por haber formado parte de mi formación académica e investigadora y por ser un ejemplo de superación personal y profesional.

A la *Dra. María Antonia Gil*, por transmitirnos a todos su gran vocación profesional y pasión por la investigación. Por la gran alegría que transmite en el trabajo todos los días. Gracias por sus consejos, darme cariño y apoyarme en los malos momentos.

A la *Dra. Cristina Cuello*, porque no es solamente una investigadora ejemplar, sino porque también la considero una gran amiga y gran consejera. Gracias por siempre regalarme una sonrisa y darme un abrazo cuando lo

necesitaba. Por las grandes charlas y confesiones, y por los muchos momentos compartidos.

A *Tatiana Tarantini* y el *Dr David del Olmo*, porque sin ellos hubiera sido imposible realizar este trabajo. Por su paciencia y las infinitas horas que hemos pasado delante del citómetro en el laboratorio. Aunque ya acabó vuestra etapa en el departamento, se os echa de menos todos los días y para mí seréis amigos para toda la vida.

A mis ex compañeros de departamento, *Jonatan, Jesús, Nacho, Carmen Almiñana, Carolina, Diego y María José*, porque siempre formareis parte de mi vida, por compartir conmigo mis risas y preocupaciones, por las interminables conversaciones y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos. En especial, a *Miguel Ángel*, por ser mi principal apoyo moral en la realización de esta Tesis, porque para mí es una de las personas más especiales y auténticas que he conocido y sé que siempre seremos amigos.

A mis “niñas” del departamento *Isabel, Cristina Patiño, Alicia y Cris Martínez*, porque son simplemente adorables. Porque llegaron a transmitir alegría e ilusión y porque para mí más que amigas, son mis “hermanas”. Os quiero.

A *Lola*, por su simpatía, por las largas conversaciones y por ayudarme siempre que te he necesitado. Gracias.

A los nuevos chicos de departamento, *Junwei y Manu*, por su alegría e ilusión, y recibirme todos los días con una sonrisa.

Al *Dr. Alain Fontobonne*, por abrirme las puertas del CERCA en la Facultad de Veterinaria de Alfort, y permitirme realizar una estancia en un sitio maravilloso, que me hizo madurar tanto personal como profesionalmente.

A la *Universidad de Murcia* y la *Fundación Seneca* por darme la oportunidad y financiación para realizar este proyecto.

A mis compañeros de trabajo en el Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia, por darme apoyo en esta última etapa de la Tesis y acogerme con cariño como parte de su equipo.

A *mis padres*, porque sé que están muy orgullosos de en lo que me he convertido, siempre han confiado en mí y me han apoyado en todas mis decisiones. Porque me han mimado muchísimo en esta etapa dura de mi vida. Os quiero.

A *Damián*, por haber compartido conmigo este camino, ilusiones y proyectos, por ser siempre positivo y confiar en mi capacidad para realizar este trabajo.

A mis hermanos, mis abuelos y amigos.

A mis animalicos que comparten conmigo mi vida y me dan su cariño sin pedir nada a cambio.

A todos los perros que han participado en este proyecto (Kobi, Trancas, Gusy, Crack, Nilo, Pipo, Hugo y Gordo), así como a sus simpáticos dueños que nos los han prestado amablemente, colaborando en el avance en el apasionante mundo de la investigación en reproducción canina.

En general a todos los que han hecho posible este trabajo.



# Index / Índice

<b>Introduction</b>	3
<b>Objectives</b>	9
<b>Extended summary</b>	13
<b>Conclusions</b>	29
<b>Introducción</b>	33
<b>Objetivos</b>	41
<b>Resumen general</b>	45
<b>Conclusiones</b>	63
<b>References/Referencias</b>	67
<b>Articles/Artículos</b>	73
<b><u>Article 1.</u></b> Quality of chilled and cold-stored (5°C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates.	75
<b><u>Article 2.</u></b> Effects of Rapid Cooling Prior to Freezing on the Quality of Canine Cryopreserved Spermatozoa	83
<b><u>Article 3.</u></b> The Effects of Hoechst 33342 Staining and the Male Sample Donor on the Sorting Efficiency of Canine Spermatozoa	93
<b>Graphic appendix/Apéndice gráfico</b>	105
<b>Abbreviations/Abreviaturas</b>	113
<b>Appendix/Apéndice</b>	117





# INTRODUCTION



Over the last years, canine breeding has received increased attention in small animal veterinary practice. Reproductive technologies had experimented an increasing interest by breeders, pet owners and institutions such as the police, fire-brigade and blind-associations (Futino et al. 2010). Currently, technologies as artificial insemination (AI) and semen conservation procedures are available and increasingly demanded. This is of great interest for dog breeding, primarily because it allows the growth of international commerce in canine semen by minimizing the cost of keeping or transporting live animals and by establishing semen bank for males with a high genetic value (Peña et al. 2006; Thomassen and Farstad, 2009).

Due to the increasing interest of chilling and cryopreservation technologies in canine species, the optimization of these procedures are the main goal of numerous investigations. Most of these studies are aimed to improving the composition of extenders for chilling dog semen (Nizánski et al. 2009; Kmenta et al. 2011; Michael et al. 2010) and to optimize different aspects of canine semen cryopreservation including modifications in extenders, cryoprotectant type, and freezing and thawing rates (Okano et al. 2004; Nöthling et al. 2005; Schäfer-Somi et al. 2006; Bencharif et al. 2010).

Despite its many advantages, it is well known that during chilling and cryopreservation procedures, spermatozoa undergo important temperature changes, resulting in the phenomenon of “cold-shock” which finally implicates an impairment of sperm quality and fertilizing ability (Watson, 2000). Susceptibility of spermatozoa to “cold-shock” differs between species and individuals, and it has been associated with the lipid composition of sperm plasma membrane (White, 1993). Particularly, during chilling and cryopreservation procedure, spermatozoa are very sensitive to the reduction from room temperature (around 23 °C) to 5 °C (White, 1993). Thereafter, the cooling rates to which spermatozoa are exposed in chilling and cryopreservation protocols, is an important factor that also influences the sperm quality.

In canine specie the studies about this factor are scarce and, although dog spermatozoa are considered relatively resistant to cooling at 5 °C (Batista et al. 2012), slow average cooling rates ranging 0.15-0.3 °C/min for chilling and prior to freezing are generally used to minimize cold-shock process. These slow cooling rates corresponding with equilibration period over 1-2 h, are commonly used in veterinary practice in combination with a Tris fructose-glucose egg yolk extender for chilling (Ponglowhapan et al. 2004; Nizánski et al. 2009) or cryopreservation of dog spermatozoa (Uppsala procedure; Shäfer-Somi et al. 2006; Hermansson and Linde-Forsberg, 2006; Neagu et al. 2010; Peña et al. 2012).

However, and despite good results are obtained applying these protocols, shortening the cool-down time from room temperature (23 °C) to 5°C for sperm as much as possible in chilling and cryopreservation protocols, would allow a considerable reduction in the time required for these procedures, which is extremely important from a practical point of view. To the best of our knowledge, there are no studies to evaluate the effects of a rapid cooling rate and therefore of reducing the cool-down period required for these procedures, on sperm quality parameters. Thereafter, we were interested in evaluating whether rapid cooling rates from room temperature to 5 °C could be successfully implemented in dog semen chilling and cryopreservation protocols.

A cryopreservation process is necessary for a long-term storage of spermatozoa. One of the most commonly used methods for canine sperm cryopreservation is the Uppsala method, which implies the use of glycerol and egg-yolk as cryoprotectants (Peña et al. 2006, Rota et al. 2006). Using this method a total of 10% of glycerol is commonly added in two steps. Briefly, a 3% of glycerol is usually included in the extender during the cold-down period and a 7% in the extender for freezing, resulting in a fractionated glycerol addition protocol (Peña et al. 2006; Hermansson and Linde-Forsberg, 2006; Neagu et al. 2010). Unfractionated glycerol addition protocol adding all cryoprotectant at 5 °C

after slow cooling has been also described (Neagu et al. 2010). Thereafter, in order to establish an optimal rapid protocol for dog semen cryopreservation, we were also interested in evaluating the effects of presence or absence of glycerol during the cool-down step in combination with a rapid cooling rate.

Besides of the interest in the optimization of dog semen conservation procedures, nowadays the study and development of new technologies applicable to the canine species in the area of reproductive biotechnology is also increasing. In this context, we have considered that the possible application of sex-sorting technology by flow cytometry in combination with other routine reproductive techniques mentioned above, such as AI, chilling or cryopreservation, could contribute relevantly to optimize the efficiency of canine breeding. Moreover, another motivation for the application of flow cytometric sperm sex sorting in canine spermatozoa could be the economic interest of breeders in generating pets of a desired sex. Since, sex-related temperamental choices often underlie the selection of dogs used to assist humans with impaired senses or dogs trained in search and rescue, this biotechnology could also be applied to the production of these animals (Garner and Seidel 2003; Meyer et al. 2008; Oi et al. 2013).

Sperm sex-sorting technology by flow cytometry has been successfully used to produce offspring of a predetermined sex in many species of domestic mammals, including cattle, swine, sheep and horses (reviewed by Garner 2006). In addition, recent studies have been performed with the aim of extending sperm sexing technology to other domestic species, such as cats (Spinaci et al. 2007; Pope et al. 2009), and to endangered and exotic mammalian species, such as primates (O'Brien et al. 2005), dolphins (O'Brien et al. 2006) alpacas (Morton et al. 2008), elephants (Hermes et al. 2009), buffaloes (Lu et al. 2010) and rhinoceros (Behr et al. 2009).

The first step for the application of sperm sex sorting technology to a new species involves the development of species-specific protocols (Maxwell et al.

2004). Optimizing the Hoechst 33342 (H-42) staining concentration for the best resolution in order to get a properly identification of X- and Y-chromosome-bearing sperm populations is one of the most important steps within flow cytometric sperm sex sorting protocols. In this basis, our aim was to establish a useful protocol for dog sperm handling prior sex-sorting.

# OBJECTIVES





The main objective of this Thesis was to optimize the protocols for chilling and cryopreservation of dog spermatozoa and to design an effective protocol for canine spermatozoa sex-sorting using flow cytometry. With this purpose, the specific objectives of the present study were:

1. To evaluate the effects of various rapid cooling rates from room temperature (23 °C) to 5°C on sperm quality of chilled and cold-stored (96 h) canine spermatozoa, using a Tris fructose extender with 20% egg yolk (*Article 1*).
2. To evaluate the effect of a rapid cooling rate prior freezing with Uppsala method in combination with a fractionated or unfractionated glycerol addition protocol (*Article 2*).
3. To optimize Hoechst 33342 staining concentrations for the flow cytometric identification and separation of X- and Y-chromosome-bearing canine spermatozoa. Additionally, to determine whether variations between dogs exist that affect the sex-sorting of spermatozoa (*Article 3*).



# EXTENDED SUMMARY



# Material and methods

## 1. Biomedical ethics

All experimental protocols were performed in accordance with Directive 2000/63/EU EEC for animal experiments, and all experiments were reviewed and approved by the Ethical Committee for Experimentation with Animals of the University of Murcia (Spain).

## 2. Reagents

All of the chemicals used in the experiments were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except propidium iodide, which was from Invitrogen (Molecular Probes, Eugene Oregon USA) and Equex STM Paste, which was from Nova Chemical Sale (Sciutate, MA, USA).

## 3. Extenders

All media were prepared under sterile conditions in a laminar flow hood (MicroH; Telstar, Terrasa, Spain) using water from a Milli-Q Synthesis System (18 M $\Omega$  cm; Millipore Co., Billerica, MA, USA).

The basic extender used in all experiments to dilute canine sperm for washing by centrifugation, analysis and incubation for sperm sex sorting, and for evaluation after thawing was a Tris-citrate-fructose extender (TCF-Ext) composed of 259 mM Trizma base, 80 mM citric acid, and 69 mM fructose at a pH of 6.7 and an osmolality of 324 mOsm/kg, supplemented with 1 mg/mL penicillin and 1 mg/mL streptomycin sulfate (Ponglowhapan et al. 2004).

The cooling and freezing extenders used in this study has been previously described for dog semen chilling and cryopreservation (Ponglowhapan et al. 2004; Hermansson and Linde-Forsberg, 2006). Briefly, a TCF-Ext supplemented with a 20% v/v egg yolk was used for chilling and cold-storage of dog spermatozoa (TCF-EY; pH 6.72; 340 mOsm/Kg). The extenders used for semen cryopreservation are described in Table 1 and were composed of TCF containing 20% egg yolk and variable glycerol concentrations with or without Equex STM Paste (Nova Chemical Sale, Scituate, MA, USA).

**Table 1.** Composition of extenders used for semen cooling and freezing.

	<b>C-Ext I</b>	<b>C-Ext II</b>	<b>F-Ext I</b>	<b>F-Ext II</b>
<b>Trizma Base</b>	3.025 g	3.025 g	3.025 g	3.025 g
<b>Citric acid</b>	1.7 g	1.7 g	1.7 g	1.7 g
<b>Fructose</b>	1.25 g	1.25 g	1.25 g	1.25 g
<b>Streptomycin</b>	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<b>Penicillin</b>	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<b>Glycerol</b>	3%	-	7%	10%
<b>Equex STM Paste</b>	-	-	1%	1%
<b>Egg yolk</b>	20%	20%	20%	20%
<b>MilliQ water</b>	77 mL	80 mL	72 mL	69 mL
<b>pH</b>	6.76	6.72	6.70	6.76
<b>Osmolarity</b>	870 mOsm	335 mOsm	1570 mOsm	1978 mOsm

*Cooling extenders (C-Ext I and II)/Freezing extenders (F-Ext I and II).*

A phosphate-buffered saline solution (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 6.8 ± 0.2; 289 ± 4 mOsm/kg) was used to dilute the fluorochromes for performing the flow cytometric evaluation of sperm viability. A PBS supplemented with 0.1 % EDTA (w/v; Del Olmo et al. 2013) served as sheath fluid during sex sorting procedure.

#### 4. Animals

A total of 8 male dogs (*Canis lupus familiaris*) of different breeds (Golden Retriever, Labrador Retriever, Weimaraner, Ibizan Hound, Scottish Terriers,

French Bulldog, Jack Russel Terrier) from private kennels, ranging between 2-5 years of age, were used as semen donors in the different experiments. The animals were clinically healthy and were routinely used for semen collection. All of them were of proved fertility and none of them was preselected according to sperm ability to resist reproductive biotechnologies.

## **5. Semen collection**

Ejaculates were collected by digital manipulation as described by Kutzler (2005) into a prewarmed calibrate 15 mL Falcon conical tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA). In all experiments, only the sperm-rich fraction (SRFs) of the ejaculates was collected and processed, while the first and third fractions were discarded.

## **6. Sperm processing**

In all experiments, SRFs were processed similarly. Immediately after semen collection SRFs were diluted 1:2 v/v in TCF-Ext and washed by centrifugation (700g / 5 min/ room temperature (23 °C); Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Germany). After centrifugation, the supernatant was then removed and the resultant sperm pellets were processed for chilling, freezing or sorting procedures depending on the experiment.

### **6.1. Chilling and cold storage of canine spermatozoa (Article 1)**

After supernatant removal, sperm pellets were re-suspended in TCF-EY and pooled or processed individually, according to the experimental design of each experiment. Once sperm concentration was evaluated, semen samples were diluted at room temperature with TCF-EY to a final concentration of  $200 \times 10^6$  spermatozoa/mL. Samples were chilled using the different cooling rates described below in the experimental design section. Once samples reached 5 °C, they were transferred and stored in a cold room at 5 °C until analysis.



## 6.2. Semen freezing and thawing (Article 2)

Sperm samples were frozen using Uppsala method, which implies two dilution steps before freezing. Briefly, after semen collection and centrifugation, resultant sperm samples were pooled or processed individually, depending of the experience. Samples were diluted at 23 °C with the C-Ext I or II to a concentration of  $400 \times 10^6$  sperm/mL and then were cooled to 5°C using different cooling rates described (see experimental design). Once at 5 °C and just prior freezing, the samples were diluted slowly by adding an equal volume of F-Ext I or II that was previously cooled to 5 °C using the same cooling rates that the corresponding diluted semen samples, resulting in a final concentration of  $200 \times 10^6$  sperm/mL. After 10 min of equilibration with the freezing extender, the semen was packed into 0.5 mL plastic straws (Minitüb, Tiefenbach, Germany) that were placed horizontally on a rack situated above the surface of liquid nitrogen at a distance of 4 cm in a closed Styrofoam box for 10 min (Freezing unit reference no. 15043/0636, Minitüb, Tiefenbach, Germany). Finally, the straws were plunged directly into liquid nitrogen.

Straws were thawed in a water bath at 70 °C for 8s (Nötling et al. 2005). The content of each straw was immediately diluted in TCF-Ext (1:2 v/v) and incubated at 38 °C for 150 min before evaluation.

## 6.3. Sperm sex-sorting by flow cytometry (Article 3)

### 6.3.1. Processing of sperm samples for sex-sorting

Washed sperm samples by centrifugation, were re-diluted with TCF-Ext to a concentration of  $100 \times 10^6$  spermatozoa/mL. The extended samples were processed and stained with increasing concentrations of H-42, as described below in the experimental design. After the addition of H-42, the spermatozoa were incubated in a water bath for 1 h at 36 °C in the dark.

Then, before being passed through the flow sorter, the stained spermatozoa were filtered through a 30- $\mu$ m nylon mesh filter (Partec CellTrics, Gorlitz, Germany) to remove debris or clumped spermatozoa. Next, 1  $\mu$ L of a 1 mg/mL food colouring dye (FD&C#40; Warner Jenkinson. St. Louis, MO, USA) was added to each sample to identify non-viable spermatozoa (FDA +) present in the samples (Morris et al. 2003; Clulow et al. 2012).

### 6.3.2. Flow cytometric sperm sex-sorting

A MoFlo SX flow cytometer/sperm sorter (Dakocytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) equipped with an ultraviolet wavelength laser (351-364 nm; Spectra Physics 1330, Mountain View, CA, USA) set to 175-mW output was used to identify and separate X-chromosome-bearing spermatozoa. Gates were placed around correctly oriented spermatozoa to achieve >85% purity in the X-chromosome-bearing population of spermatozoa.

A software program (SUMMIT; DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA) produced a graphical representation of the spermatozoa as they were detected by flow cytometer. The first parameter evaluated was the ability of the samples to split a population, and only samples that resolved into clear X-and Y-chromosome-bearing sperm population, were analyzed for sorting efficiency. In these samples, the percentages of non-viable spermatozoa (FDA +), oriented spermatozoa (OS), selected spermatozoa (SS) and the average sorting rates (SR, sorted spermatozoa/s) were analyzed to determinate sorting efficiency.

The X-chromosome-bearing sperm population was selected and collected in a 50 mL Falcon conical tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA) containing 2.5 mL of TCF-EY. After sorting, the samples of spermatozoa were pelleted (3000g for 4 min; Megafue 1.0; Heraeus) and the resultant pellet was re-diluted in TCF-EY to a concentration of approximately  $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL for the evaluation of sperm quality.

## 7. Sperm quality assessment

The inclusion criteria for fresh semen quality were at least  $200 \times 10^6$  spermatozoa/mL, 70% total motility, 60% progressive motility and 80% normal morphology.

### 7.1. Sperm motility

The motility of spermatozoa was evaluated objectively using a computer-assisted analysis system (ISAS; Proiser R+D, Paterna, Spain). The samples were analyzed at a concentration of  $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL. For each evaluation, an aliquot of 5  $\mu$ L was placed in a Makler counting chamber (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) that was pre-warmed to 38 °C. A minimum of 200 spermatozoa per sample was analyzed. The sperm motility variables recorded were the overall percentage of total motility (TM) and the progressive motility (spermatozoa displaying a fast and progressive movement; PM). Spermatozoa with an average path velocity (VAP)  $\geq 20 \mu\text{m/s}$  were considered motile, in accordance with the parameters provided by the manufacturer. In chilled and frozen-thawed semen (articles 2 and 3), the following parameters of quality of movement were also measured: curvilinear velocity (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), straight line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), linear coefficient (LIN %) and amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ).

### 7.2. Sperm viability

Sperm viability was evaluated by a simultaneous flow cytometric assessment of the plasma and acrosomal membrane integrity using a triple-fluorescence procedure as described previously by Martinez-Alborcia et al. (2012) and modified for canine spermatozoa. Briefly,  $2 \times 10^6$  spermatozoa were transferred to tubes containing 50  $\mu$ L of TFC-Ext, 4  $\mu$ L of H-42 (0.05 mg/mL in PBS), 1  $\mu$ L of propidium iodide (PI; 0.5 mg/mL in PBS; Molecular Probes Europe BV, Leiden, the Netherlands) and 2  $\mu$ L of fluorescein-conjugated peanut agglutinin (FITC-

PNA, 20 µg/mL in PBS). Flow cytometry analyses were performed using a BD FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were acquired using BD FACSDiva Software (Becton Dickinson & Company). In all articles, results corresponding to viable spermatozoa (having intact plasma and acrosomal membranes; PI-/FITC-PNA-) were included. In addition, in article 3 percentages of spermatozoa showing damaged/reacted acrosomes (FITC-PNA +) were included in the results.

# Experimental design and results

**Objective 1:** *To evaluate the effects of various rapid cooling rates from room temperature (23 °C) to 5 °C on sperm quality of chilled and cold-stored (96 h) canine spermatozoa, using a Tris fructose extender with 20% egg yolk (Article 1).*

## **Experiment 1:**

In this experiment, the effect of different cooling rates on quality of chilled and cold-stored canine spermatozoa was evaluated. For this purpose, processed SRFs from five dogs were pooled and divided into four aliquots that were chilled from 23 to 5 °C at rates of 2.25, 0.9, 0.45 and 0.2 °C/min. The last aliquot, chilled at 0.2°C/min, served as the control group. The 2.25 °C/min cooling rate was achieved by plunging the tube of extended semen into a 250 mL glass beaker containing 200 mL of water at 4°C. The 0.9 °C/min cooling rate was achieved by submersing the tube of extended semen into a 500 mL plastic beaker containing 250 mL of water at 23 °C, which was cooled gradually to 5 °C by inserting ice packs (stored at -20 °C in the freezer). The temperature of the samples and of the water during cooling was recorded throughout the procedure. A programmable temperature bath (Programmable Model 9612; PolyScience, Niles, IL, USA) was used to perform the cooling rates for the 0.45 °C/min and control samples.

Sperm quality in terms of sperm motility and viability were assessed for fresh spermatozoa (washed by centrifugation and analyzed at room temperature before starting the chilling process) and for chilled samples, immediately after chilling (0h) and after 24, 48, 72, and 96 hours of storage at 5 °C. At each evaluation time, 100 µL samples were collected and re-warmed in a water bath at 37 °C for 5 min before sperm quality was assessed.

The cooling rate did not significantly influence the percentages of TM, PM and viable spermatozoa at any evaluation time during cold-storage at 5 °C. Since there were not significant differences among different cooling rates, average

values of TM, PM and viable spermatozoa for all samples immediately after chilling were around of 85%, 68% and 88%, respectively. The time of cold storage at 5 °C significantly influenced ( $P < 0.05$ ) the percentage of TM, PM and viable spermatozoa. Values for TM, PM and viable spermatozoa remains above 62%, 45% and 82%, respectively after 96 h of cold-storage at 5 °C.

In addition, the quality of movement parameters were not significantly influenced by the cooling rate at any evaluated time-point during cold storage. Average values for samples chilled at different cooling rates throughout the period of cold storage for VCL, VSL, LIN and ALH were  $140.5 \pm 5.3 \mu\text{m/s}$ ,  $92.3 \pm 3.8 \mu\text{m/s}$ ,  $66.5 \pm 1.8 \%$  and  $4.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , respectively.

### **Experiment 2:**

Because there were no significant differences among the different cooling rates used in experiment one on sperm quality parameters, the aim in experiment two was to evaluate the individual response of dog spermatozoa to a rapid cooling rate.

In this experiment, SRFs from the same five dogs used in experiment one were chilled individually at the most rapid and control cooling rates ( $2.25 \text{ }^\circ\text{C/min}$  and  $0.2 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , respectively) and kept in cold storage at 5 °C for 96 h. Sperm quality was evaluated as described for experiment one.

The use of a rapid or slow cooling rate did not significantly influence the TM, PM and viable spermatozoa percentages at any evaluated time during cold storage.

There were significant differences among males ( $P < 0.05$ ) in their TM, PM and viable spermatozoa percentages at all evaluation times during cold storage at 5 °C. The interaction between the individual males and the cooling rate was not significant. Similarly, there was no significant interaction between the individual males and time of cold storage.

*Objective 2: To evaluate the effect of a rapid cooling rate prior freezing with Uppsala method in combination with a fractionated or unfractionated glycerol addition protocol (Article 2).*

### **Experiment 1:**

In experiment 1, the aim was to evaluate the effect on post-thawing sperm quality of a rapid cooling rate prior cryopreservation by Uppsala method. Moreover, the effect of a fractionated or unfractionated glycerol addition in a rapid freezing protocol was evaluated. For this purpose, a total of 30 SRFs from 6 dogs (5 replicates) were processed. The resulting samples from each dog were pooled and divided into 4 aliquots, which were frozen by the Uppsala method using 2 different cooling rates (control 0.2 °C/min or rapid 2.25 °C/min) and 2 glycerol addition protocols (fractionated or un-fractionated).

The 2.25 °C/min cooling rate was achieved by plunging the tube of extended semen into a 250 mL glass beaker containing 200 mL of water at 4 °C, while a programmable temperature bath (Programmable Model 9612; PolyScience, Niles, IL, USA) was used to perform the control rate of cooling. For addition of the fractionated glycerol, the semen samples were diluted in C-Ext I at 23 °C and in F-Ext I at 5 °C prior to freezing. For addition of the unfractionated glycerol, the semen samples were diluted in C-Ext II at 23 °C and in F-Ext II at 5 °C prior to freezing.

Sperm quality in terms of sperm motility and viability were assessed at 30 and 150 min of incubation at 38 °C after sperm thawing. A total of 60 frozen-thawed straws (3 straws per each of the 4 treatments and replicate) were analyzed.

Within the same glycerol addition protocol, use of the rapid or control cooling rate prior to freezing did not significantly affect the percentages of TM, PM and viable spermatozoa at either 30 or 150 min after thawing.

The glycerol addition protocol significantly affected the values of the TM, PM and viable spermatozoa ( $P < 0.05$ ) at 30 min and the viable spermatozoa ( $P < 0.05$ ) at 150 min of incubation after thawing in samples frozen using the control cooling rate. Values of TM, PM and viable spermatozoa were slightly higher when an un-fractionated glycerol addition protocol were used in comparison with a fractionated protocol.

The sperm quality of movement parameters were not significantly influenced by the cooling rate or by the glycerol addition protocol at any post-thawing evaluation time.

### **Experiment 2:**

Based in the results obtained in experiment 1, the aim of this experiment was to evaluate the individual response to the use of a rapid cooling rate prior to freezing with Uppsala method. A total of 20 SRFs from 4 dogs (5 replicate) were collected and frozen individually using the same cooling rates described in experiment 1 (control 0.2 °C/min and rapid 2.25 °C/min) in combination with an unfractionated glycerol protocol.

Sperm quality was assessed in frozen-thawed semen at 30 and 150 of incubation after thawing. A total of 30 frozen-thawed straws were analyzed for each male (3 straw per each of the 2 treatments and replicate).

There were significant differences among the males ( $P < 0.01$ ) for TM, PM and sperm viability at 30 min after thawing while these differences were significant only for sperm viability 150 min post-thawing. There were no significant differences in the percentages of TM, PM and viable spermatozoa among the samples that were frozen using different cooling rates at either 30 or 150 min after thawing. The interaction of the male and the cooling rate was not significant.



**Objective 3:** *To optimize Hoechst 33342 staining concentrations for the flow cytometric identification and separation of X- and Y-chromosome-bearing canine spermatozoa. Additionally, to determine whether variations between dogs exist that affect the sex-sorting of spermatozoa (Article 3).*

In this experiment, 18 SRFs from six dogs (three SRFs per dog) were used. After semen collection, the SRFs were processed for sperm sex-sorting as follows. The samples were split into four aliquots of 1 mL of diluted semen each, containing  $100 \times 10^6$  spermatozoa/mL. Each aliquot was stained with four increasing concentration of H-42: 5, 7.5, 10 and 12.5  $\mu$ L of H-42 stock solution (5 mg/mL in bidestilated water). X-chromosome bearing sperm were collected and centrifuged at 3000g for 4 min.

For analysis of sperm quality, the percentages of TM, viable spermatozoa and spermatozoa with damaged/reacted acrosome were evaluated. Samples were evaluated for these sperm quality parameters at various steps throughout the development of the experience, namely after first centrifugation, and before the staining procedure (fresh spermatozoa), immediately after the sorting process (AS; evaluated at approximately  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL) and finally, after sorting and centrifugation (AC; evaluated at  $20 \times 10^6$  spermatozoa/mL)

The ability of dog spermatozoa to produce a clear split and an adequate identification of X and Y chromosome bearing sperm population was significantly influenced by H-42 staining ( $P < 0.01$ ), but not by the male sample donor. X-and Y-sperm populations were identified in 77.5% of the samples stained with 5 $\mu$ L of H-42, while this percentage was 100% in all the samples stained with 7.5, 10 and 12.5  $\mu$ L of H-42.

Because the ability to produce split of 5  $\mu$ L H-42 stain was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than those obtained using the other concentrations tested, only the values for sorting parameters corresponding to 7.5, 10 and 12.5  $\mu$ L H-42 stains were analyzed.

Percentages of spermatozoa FDA+, OS, SS and average SR (spermatozoa/s) were significantly influenced by the identity of the male sample donor ( $P < 0.01$ ) but not by the H-42 concentration used. The percentages of OS ranged from 26.1 to 45.7% and the SR obtained for those males ranged from 3100 to 4600 events per second.

Evaluation of sperm quality parameters showed that sex-sorting process did not affect significantly sperm quality, regardless of H-42 concentration used. The values of TM and percentage of viable spermatozoa were similar in the fresh and after-sorting (AS) samples, with the values for both parameters being between 85 and 90%. However, after the centrifugation step (AC), the percentages of TM and of viable sorted spermatozoa were significantly lower than those obtained from the fresh and AS samples, ( $P < 0.01$ ), ranging from 61% to 72% and from 69% to 75%, respectively.



# CONCLUSIONS



1. The use of a rapid cooling rate of 2.25 °C/min can be an efficient alternative to the use of a slow cooling rate in protocols for chilling canine semen using a TCF 20% egg yolk extender, maintaining optimal values of sperm quality during a long period of cold-storage (96 h).
2. Dog spermatozoa can be cryopreserved using a rapid cooling rate of 2.25°C/min prior to freezing with the Uppsala method, in combination with a fractionated or unfractionated glycerol addition procedure.
3. Sperm sex-sorting by flow cytometry can be performed successfully in canine samples using between 7.5 and 12.5 µL of Hoechst 33342. In addition, significant individual differences are evident in the sorting efficiency of canine spermatozoa.



# INTRODUCCIÓN





El interés por la reproducción en la especie canina y especialmente por su aplicación práctica en clínica de pequeños animales, se ha incrementado en los últimos años. Actualmente, biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA) y procedimientos para la conservación de espermatozoides como la refrigeración y criopreservación son técnicas muy demandadas, fundamentalmente por criadores de razas puras y asociaciones caninas, pero también por propietarios particulares (Thomassen y Farstad, 2009).

Sin embargo, la aplicación de estas biotecnologías en la reproducción canina, no solo es interesante desde un punto de vista económico o lucrativo, sino que también es de gran importancia en los programas de cría de perros destinados a la guía de invidentes, trabajo o salvamento en instituciones como la Policía y Bomberos (Futino y cols. 2010). También es destacable la repercusión que estos procedimientos de IA y conservación de semen pueden tener en programas de recuperación de razas en peligro de extinción, así como de especies de cánidos silvestres (Thomassen y Farstad, 2009).

Además, estas biotecnologías están contribuyendo a la expansión del mercado internacional de semen canino, gracias a las ventajas que presentan a la hora de minimizar costes, ya que eliminan la necesidad de transportar animales vivos, facilitando la aplicación de la IA (Peña y cols. 2006; Thomassen y Farstad, 2009). La creación de bancos de semen para la preservación de recursos genéticos provenientes de machos de gran valor es otra de las aplicaciones en las que estas técnicas reproductivas resultan herramientas fundamentales (Peña y cols. 2006).

Debido a sus múltiples ventajas y al interés que despiertan los procedimientos de conservación de semen, la optimización de estos protocolos ha sido y sigue siendo objetivo de la mayoría de investigaciones en el campo de la reproducción canina. En este sentido, se han realizado numerosos estudios enfocados, no solo a la mejora de los medios para la refrigeración de espermatozoides (Nizánski y cols. 2009; Kmenta y cols. 2011; Michael y cols. 2010), sino también a la optimización de diferentes aspectos de la

criopreservación espermática, incluyendo variaciones en la composición de los medios, tipos de crioprotectores utilizados y diferentes ratios de congelación y descongelación (Okano y cols. 2004; Nöthling y cols. 2005; Shäfer-Somi y cols. 2006; Bencharif y cols. 2010).

No obstante, a pesar de las muchas ventajas que conllevan estos procedimientos para la conservación de espermatozoides a medio y largo plazo, la fertilidad obtenida mediante IA con semen conservado es, en general, menor que la obtenida con semen fresco (Thomassen y Farstad, 2009). Esto es debido a que durante los procesos de refrigeración y criopreservación seminal, las células espermáticas son sometidas a importantes cambios de temperatura dando lugar a un fenómeno conocido como “choque frío” (Watson, 2000). Este fenómeno implica la disrupción y daño en las membranas lipídicas de los espermatozoides (Parks y Graham, 1992), ocasionando una reducción de los parámetros de calidad espermática como son la motilidad y viabilidad, y comprometiendo su capacidad fecundante (Watson, 2000). La susceptibilidad de los espermatozoides a este fenómeno de “choque frío” parece estar relacionada con la composición lipídica de la membrana plasmática de los mismos, especialmente de los ácidos grasos, siendo diferente entre especies e incluso entre individuos de la misma especie (White, 1993).

En la actualidad es un hecho comprobado que los espermatozoides son extremadamente sensibles a la disminución de la temperatura desde rangos alrededor de los 23 °C (temperatura ambiental) hasta rangos situados en torno a los 5 °C (White, 1993), temperatura a la que son expuestos durante los procesos de refrigeración y criopreservación seminal. Por lo tanto, la calidad y funcionalidad de los espermatozoides caninos conservados puede verse influida de manera importante por la ratio de enfriamiento empleado desde los 23 °C hasta los 5 °C.

A pesar de ello, los estudios realizados al respecto en esta especie son escasos y, aunque los espermatozoides de perro son considerados relativamente

resistentes a la refrigeración a 5 °C (Batista y cols. 2012) y podrían utilizarse velocidades de enfriamiento rápidas, en los protocolos de refrigeración y criopreservación espermática se utilizan de forma rutinaria ratios de enfriamiento lento (entre 0,15 y 0,3 °C/min) con el fin de disminuir los efectos negativos del fenómeno de “choque frío”.

Estas ratios de enfriamiento lento determinan periodos de equilibrado (llegada a 5°C) de entre 1 y 2 horas aproximadamente y, de forma general, se utilizan en la práctica clínica junto con un medio Tris-glucosa-fructosa al que se le adiciona un 20% de yema de huevo para la refrigeración (Ponglowhapan y cols. 2004; Nizanski y cols. 2009) y para la criopreservación de semen canino (Método Uppsala; Schäfer-Somi y cols. 2006; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Neagu y cols. 2010; Peña y cols. 2012).

Desde un punto de vista práctico, resultaría muy interesante la disminución del tiempo empleado en enfriar las muestras de semen hasta 5 °C durante los procesos de conservación, lo que supondría una considerable reducción del tiempo total necesario para llevar a cabo dichos procedimientos. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, una de las hipótesis de nuestro trabajo es determinar si la utilización de ratios de enfriamiento rápidos desde temperatura ambiente (23 °C) hasta 5 °C pueden ser empleados con éxito para la refrigeración y criopreservación de semen canino.

Por otra parte, la conservación de los espermatozoides caninos a largo plazo implica de forma obligatoria la criopreservación de los mismos. Uno de los métodos más utilizados para este procedimiento de conservación es el Uppsala, en el cual se combinan la yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores (Rota y cols. 2006, Peña y cols. 2006). La aplicación de este método conlleva la adición de un 10% de glicerol que habitualmente es añadido en dos etapas. Una primera etapa donde se añade un 3% al medio durante la fase de enfriamiento a 5 °C y una segunda donde se añade un 7% al segundo diluyente para la criopreservación, dando lugar a un protocolo de adición fraccionada de glicerol

(Peña y cols. 2006; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Neagu y cols. 2010). También ha sido descrito un protocolo en el que el glicerol es añadido de forma no fraccionada, consistente en la incorporación de la totalidad del mismo después del periodo de enfriamiento a 5 °C e inmediatamente antes de la criopreservación (Neagu y cols. 2010). Por consiguiente, con el fin de diseñar un protocolo útil de criopreservación incluyendo una ratio de enfriamiento rápido, también se consideró interesante evaluar el posible efecto de la adición fraccionada o no de glicerol.

Teniendo en cuenta el gran interés actual por la reproducción en la especie canina, es importante realizar investigaciones en el desarrollo de nuevas biotecnologías reproductivas aplicables en esta especie. En especial, sería muy interesante poder combinar técnicas utilizadas de forma rutinaria, como la IA y los protocolos de conservación seminal, con otras técnicas reproductivas como la preselección del sexo de la descendencia mediante separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo. La aplicación de esta técnica contribuiría a una mayor rentabilidad de la cría de ejemplares de razas puras, dado que permitiría obtener mascotas del sexo deseado, lo cual va acompañado de un gran interés económico. Además, también podría ser muy interesante en el campo de la cría de perros guía o entrenados para rescate, ya que se ha establecido una relación entre el sexo y el temperamento, influyendo de forma importante en la selección de estos animales (Garner y Seidel, 2003; Meyer y cols. 2008; Oi y cols. 2013).

La tecnología de separación de espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo ha sido aplicada con éxito para obtener crías del sexo deseado en varias especies domésticas como son el ganado vacuno, porcino, ovino y equino (Garner, 2006). Además, recientemente, se han llevado a cabo múltiples estudios con el fin de extender la aplicación de esta tecnología a otras especies domésticas como el gato (Spinaci y cols. 2007; Pope y cols. 2009), así como a ciertas especies en peligro de extinción y/o salvajes, como son los primates (O' Brien y cols. 2005),

delfines (O'Brien y cols. 2006), alpacas (Morton y cols. 2008), elefantes (Hermes y cols. 2009), búfalos (Lu y col. 2010) y rinocerontes (Behr y cols. 2009).

El primer paso para la aplicación con éxito de esta técnica en una nueva especie sería el desarrollo de un protocolo específico optimizado y adaptado para dicha especie (Maxwell y cols. 2004). La optimización del protocolo de tinción mediante el ajuste de la concentración de Hoechst 33342, con el fin de conseguir una correcta identificación de las poblaciones espermáticas X e Y, es una de las etapas más importantes en la puesta a punto de la separación espermática por citometría de flujo. Consecuentemente, nuestro propósito fue establecer un protocolo eficaz para la manipulación de los espermatozoides caninos antes de la separación.



# OBJETIVOS





El objetivo general de esta Tesis fue optimizar los procedimientos de conservación de semen, así como diseñar un protocolo para la separación de espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo en la especie canina. Con este propósito, los objetivos principales de esta tesis fueron:

1. Evaluar el efecto de diferentes ratios de enfriamiento rápido, desde temperatura ambiente (23 °C) hasta 5 °C, sobre la calidad del semen canino refrigerado y conservado durante 96 horas, utilizando un medio de Tris fructosa con un 20% de yema de huevo (*Artículo 1*).
2. Evaluar el efecto de una ratio de enfriamiento rápido antes de la congelación sobre la calidad del semen canino criopreservado utilizando el método Uppsala, en combinación con la adición fraccionada o no de glicerol (*Artículo 2*).
3. Optimizar las concentraciones de Hoechst 33342 para la identificación y separación de los espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo y determinar si existen variaciones entre individuos que afecten al proceso de separación espermática en la especie canina (*Artículo 3*).



# RESUMEN GENERAL



# Material y métodos

## 1. Ética biomédica

Todos los experimentos incluidos en esta Tesis Doctoral se realizaron de acuerdo a la Directiva 2010/63/EU EEC para la experimentación animal, y fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité Bioético de la Universidad de Murcia (España).

## 2. Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich S.A. Química (St Louis, MO, USA), excepto el yoduro de propidio y el Equex STM Paste, que fueron proporcionados por Invitrogen (Molecular Probes, Eugene Oregon USA) y Nova Chemical Sale (Sciutate, MA, USA), respectivamente.

## 3. Medios

Todos los medios utilizados en este trabajo fueron preparados en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad (Micro H; Telsar, Tarrasa, España), usando agua purificada procedente de un Sistema Milli-Q (18 M $\Omega$  cm; Millipore Co., Billerica, MA, USA).

El medio básico utilizado en todos los experimentos con el fin de diluir los espermatozoides en los procedimientos de centrifugación, análisis e incubación para la separación espermática o para su evaluación tras la descongelación, fue un medio Tris-citrato-fructosa (TCF) compuesto de 249 mM Trizma base, 80 mM ácido cítrico, 69 mM fructosa (pH 6,7; osmolaridad 324 mOsm/Kg), suplementado con 1 mg/mL de penicilina y 1 mg/mL de estreptomicina sulfato; Ponglowhapan y col. 2004).

Todos los medios usados en este estudio han sido previamente descritos para la refrigeración y criopreservación de semen canino (Ponglowhapan y col. 2004; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006). Para la refrigeración y conservación de los espermatozoides a 5 °C se empleó un medio TCF suplementado con un 20% de yema de huevo (pH 6,72; osmolaridad 340 mOsm/Kg).

Los diluyentes utilizados para la criopreservación espermática consistieron en un medio TCF con un 20% de yema de huevo y concentraciones variables de glicerol, con o sin Equex STM Paste. Dichos diluyentes fueron clasificados como medios de refrigeración (añadidos a temperatura ambiente en la primera etapa del proceso de criopreservación) o de congelación (añadidos a 5 °C en la segunda etapa del proceso de criopreservación). Su composición se muestra a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de los medios utilizados para refrigeración y congelación de semen.

	Refrigeración I	Refrigeración II	Congelación I	Congelación II
<b>Trizma Base</b>	3.025 g	3.025 g	3.025 g	3.025 g
<b>Ácido cítrico</b>	1.7 g	1.7 g	1.7 g	1.7 g
<b>Fructosa</b>	1.25 g	1.25 g	1.25 g	1.25 g
<b>Estreptomicina</b>	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<b>Penicilina</b>	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
<b>Glicerol</b>	3%	-	7%	10%
<b>Equex STM Paste</b>	-	-	1%	1%
<b>Yema de huevo</b>	20%	20%	20%	20%
<b>Agua Milli Q</b>	77 mL	80 mL	72 mL	69 mL
<b>pH</b>	6.76	6.72	6.70	6.76
<b>Osmolaridad</b>	870 mOsm	335 mOsm	1570 mOsm	1978 mOsm

Los fluorocromos empleados para la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides mediante citometría de flujo fueron diluidos en una solución salina fosfatada (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 8.1 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH  $6.8 \pm 0.2$ ;  $289 \pm 4$  mOsm/kg). Como líquido circulante para el proceso de separación espermática mediante citometría de flujo, fue utilizado una solución salina fosfatada (PBS) suplementada con un 0,1% de EDTA (peso/volumen; Del Olmo y cols. 2013).

#### **4. Animales**

Como donantes de semen, se utilizaron un total de 8 machos de la especie canina (*Canis Lupus Familiaris*) de diferentes razas (Golden Retriever, Labrador Retriever, Braco Alemán, Podenco Ibicenco, Scottish Terrier, Bulldog Francés y Jack Russel Terrier). Todos ellos pertenecían a propietarios particulares y tenían un rango de edad entre 2 y 5 años. Los animales estaban clínicamente sanos y eran utilizados de forma rutinaria para extracciones seminales.

#### **5. Recogida de las muestras**

Los eyaculados fueron recogidos mediante estimulación manual, según el método descrito con anterioridad por Kutzler (2005), en tubos Falcon de 15 mL (Becton Dickinson Franklin Lakes NJ, USA) previamente atemperados a 38 °C. En todos los experimentos llevados a cabo, solamente fueron recogidas y procesadas las fracciones espermáticas de los eyaculados.

#### **6. Procesado de las muestras**

Inicialmente, las fracciones espermáticas fueron procesadas de forma similar en todos los experimentos. Inmediatamente tras la recogida, dichas fracciones fueron diluidas 1:2 con medio TCF y lavadas mediante centrifugación (700g/5min/temperatura ambiente; Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Alemania). Tras este paso, se retiró el sobrenadante y los pellets resultantes se procesaron según la experiencia para su refrigeración y/o criopreservación y separación por citometría de flujo, respectivamente, tal y como se describe a continuación.



### **6.1. Refrigeración y posterior conservación de los espermatozoides (Artículo 1)**

Los pellets resultantes de la centrifugación fueron resuspendidos en medio TCF con un 20% de yema de huevo y mezclados en un pool o procesados de forma individual según se describe a continuación en el diseño experimental. Tras la evaluación de la concentración espermática, las muestras fueron diluidas a temperatura ambiente (23 °C) con un medio TCF con 20% de yema de huevo a una concentración final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A continuación las muestras se refrigeraron utilizando las diferentes ratios de enfriamiento que se describen más adelante en el diseño experimental. Una vez que las muestras alcanzaron una temperatura de 5 °C, fueron conservadas a esta temperatura hasta su posterior análisis.

### **6.2. Criopreservación de los espermatozoides (Artículo 2)**

Las muestras se congelaron mediante el método Uppsala, el cual se basa en dos etapas de dilución de los espermatozoides a diferentes temperaturas separadas por una rampa de enfriamiento de temperatura ambiente (23 °C) hasta 5 °C. Los pellets obtenidos por centrifugación, como ha sido descrito anteriormente, fueron procesados de forma individual o bien mezclados en un pool, dependiendo de la experiencia. Para llevar a cabo el proceso de criopreservación, en primer lugar, las muestras fueron diluidas con medio de refrigeración I o II hasta una concentración de  $400 \times 10^6$  espermatozoides/ mL. A continuación, las muestras fueron enfriadas desde temperatura ambiente hasta una temperatura de 5 °C utilizando las ratios de enfriamiento descritas más adelante en el diseño experimental. Una vez a 5 °C e inmediatamente antes de la congelación, las muestras fueron diluidas a una concentración de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL con medio de congelación I o II previamente enfriado a la misma temperatura que el semen. Tras 10 minutos de equilibrado con el medio de congelación, el semen fue envasado en pajuelas de 0,5 mL (Minitüb, Tiefenbach, Germany), las cuales una vez llenas y selladas, fueron colocadas de

forma horizontal en una rejilla situada 4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido y expuestas durante 10 minutos a los vapores generados por este (Unidad de congelación referencia nº 15043/0636, Minitüb, Tiefenbach, Germany). Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas directamente en el nitrógeno líquido y guardadas en tanques de almacenamiento hasta su análisis.

Las muestras de espermatozoides criopreservados fueron descongeladas por inmersión durante 8 s en una baño de agua a una temperatura de 70 °C (Nötling y cols. 2005). Para el análisis de los distintos parámetros de calidad evaluados, el contenido de cada pajuela fue diluido en el mismo volumen de medio TCF atemperado (dilución 1:2) e incubado durante 150 min en una estufa a 38 °C.

### **6.3. Separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo en la especie canina (Artículo 3)**

#### **6.3.1. Preparación de las muestras**

Los pellets de espermatozoides resultantes de la centrifugación fueron diluidos con medio TCF hasta una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Las muestras se tiñeron con diferentes concentraciones de H-42, tal y como se describe más adelante en el diseño experimental, e incubadas en un baño maría a 36 °C durante 1 hora en condiciones de oscuridad. Una vez teñidas las muestras fueron filtradas utilizando un filtro de nylon de 30 µm (Partec CellTrics, Gorlitz, Germany) para eliminar tanto los espermatozoides agregados como las partículas de suciedad. Inmediatamente antes de su paso por el citómetro de flujo, se añadió 1 µL de colorante alimentario (FD&C40: 1 mg/mL en agua bidestilada; Warner Jenkinson St. Louis, MO, USA) a cada una de las muestras con el fin de identificar los espermatozoides no viables en las muestras teñidas (Morris y cols. 2003; Clulow y cols. 2012).

### 6.3.2. Identificación y separación de espermatozoides X e Y

Para la identificación de los espermatozoides en función de su dotación cromosómica X o Y, así como para la separación de los espermatozoides que portan un cromosoma X en el caso de nuestro estudio, se utilizó un citómetro MoFlo SX (DakoCytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) equipado con un láser ultravioleta (351-C64 nm; Spectra Physics 1330, Mountain View, CA, USA) operando a 175 mW de potencia. El tamaño de la población seleccionada para su separación (espermatozoides portadores del cromosoma X) se estableció para conseguir un mínimo de pureza igual o superior al 85%.

El análisis de las muestras y la identificación de las poblaciones espermáticas, se realizó mediante la utilización del programa informático SUMMIT (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA), el cual genera una representación gráfica de las poblaciones espermáticas detectadas por el citómetro de flujo. El primer parámetro utilizado para evaluar la eficiencia del proceso de separación de espermatozoides X e Y fue la capacidad de las muestras para mostrar de forma definida las dos poblaciones espermáticas X e Y (capacidad para la formación de split). En las muestras que mostraron split se analizaron los porcentajes de espermatozoides no viables (teñidos con el colorante alimentario, FDA+), espermatozoides correctamente orientados, espermatozoides seleccionados o separados, así como finalmente la velocidad de separación (espermatozoides separados/s).

Como se ha señalado anteriormente, en este estudio se separaron los espermatozoides portadores del cromosoma X. Una vez analizada la muestra e identificada la población a separar se recogieron 20 millones de espermatozoides en tubos Falcon de 50 mL (Becton Dickinson Franklin Lakes NJ, USA) con 2,5 mL de medio TCF con 20% de yema de huevo. Posteriormente, las muestras separadas se centrifugaron (3000 x g durante 4 min; Megafuge 1.0; Heraeus) y se rediluyeron a una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL en TCF con 20% de yema de huevo.

## 7. Análisis de la calidad de las muestras

Los criterios de inclusión de las muestras en los estudios fueron concentración igual o superior a  $200 \times 10^6/\text{mL}$ , motilidad total igual o superior al 70% y porcentaje de espermatozoides con morfología normal de al menos un 80%.

### 7.1. Motilidad espermática

La motilidad de los espermatozoides fue evaluada de forma objetiva utilizando un sistema de análisis computerizado (ISAS; Proiser R+D Paterna, España). Las muestras se analizaron a una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Para ello, en cada evaluación, se depositó un volumen de 5  $\mu\text{L}$  en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) atemperada a 38 °C y se analizaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra. Los parámetros de motilidad evaluados en todas las muestras fueron el porcentaje total de espermatozoides motiles (motilidad total; MT) y el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y rápido (motilidad progresiva; MP). Los espermatozoides con una velocidad promedio (VAP)  $\geq 20 \mu\text{m/s}$  fueron considerados mótils de acuerdo con los parámetros establecidos por el programa. Tanto en las muestras refrigeradas como criopreservadas (artículos 1 y 2), también se evaluaron los siguientes parámetros de calidad de movimiento: velocidad curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad rectilínea (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), coeficiente de linealidad (LIN; %) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH;  $\mu\text{m}$ ).

### 7.2. Viabilidad espermática

El análisis de la viabilidad de las células espermáticas se realizó mediante la evaluación simultánea de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal. Para ello se utilizó un protocolo de triple tinción con fluorocromos y citometría de flujo descrito previamente para espermatozoides de verraco (Martinez-Alborcia y cols. 2012) y modificado en nuestro laboratorio para

espermatozoides caninos. Así, una muestra de  $2 \times 10^6$  espermatozoides fue teñida con 2  $\mu\text{L}$  de H-42 (0,05 mg/mL en PBS), 1  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (IP; 0,5 mg/mL en PBS) y 2  $\mu\text{L}$  de fluoresceína conjugada con aglutinina de cacahuete (PNA-FICT; 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS).

Para el análisis de las muestras se utilizó un citómetro de flujo (BD FACSCanto, Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA). En todos los experimentos de esta Tesis se analizaron los resultados correspondientes al porcentaje de espermatozoides viables (membrana plasmática y acrosomal intactas; IP-/PNA-FICT-). Los resultados correspondientes al porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados/reaccionados (PNA-FICT+) fueron analizados únicamente en el *artículo 3*.

# Diseño experimental y resultados

**Objetivo 1:** *Evaluar el efecto de diferentes ratios de enfriamiento rápido, desde temperatura ambiente (23 °C) hasta 5 °C, sobre la calidad del semen canino refrigerado y conservado durante 96 horas, utilizando un medio de Tris fructosa con un 20% de yema de huevo (Artículo 1).*

## Experimento 1

En este primer experimento, se evaluó el efecto de diferentes ratios de enfriamiento sobre la calidad del semen canino refrigerado y posteriormente conservado a 5 °C. Para ello, las fracciones espermáticas de cinco perros fueron lavadas por centrifugación, siendo agrupados posteriormente los pellets resultantes en un pool. Dicho pool fue dividido en cuatro alícuotas, las cuales se refrigeraron desde temperatura ambiente (23 °C) hasta 5 °C utilizando diferentes ratios de enfriamiento (2,25, 0,9, 0,45 and 0,2 °C/min, sirviendo esta última como grupo control). El enfriamiento del semen a una velocidad de 2,25 °C/min fue llevado a cabo mediante la inmersión directa del tubo con la muestra en un vaso con 200 mL de agua fría a 4 °C. La ratio de 0,9 °C/min se realizó mediante la inmersión del tubo con la muestra en 250 mL de agua a temperatura ambiente (23 °C), la cual fue gradualmente enfriada hasta 5 °C mediante la inmersión de bolsas de hielo previamente guardadas a -20 °C en el congelador. Tanto la temperatura de las muestras como del agua fue monitorizada con un termómetro durante todo el procedimiento. Finalmente, las ratios de 0,45 y 0,2 °C/min se llevaron a cabo usando un baño programable (modelo 9612, PolyScience, Niles, IL, USA).

Tal y como se describe anteriormente, la calidad de los espermatozoides fue evaluada mediante el análisis de los parámetros de motilidad y viabilidad espermática. En este experimento dicha evaluación se llevó a cabo tanto en semen fresco (fracciones espermáticas centrifugadas y evaluadas a temperatura

ambiente antes del comienzo del proceso de refrigeración), como en las muestras refrigeradas inmediatamente tras alcanzar los 5 °C (0 h) y a las 24, 48, 72 y 96 h de conservación a dicha temperatura. En cada uno de los tiempos de evaluación se tomaron alícuotas de 100 µL de muestra, las cuales fueron atemperadas a 37°C en un baño maría antes de su análisis.

La ratio de enfriamiento utilizada no influyó de forma significativa ni en los porcentajes de MT y MP, ni en el de espermatozoides viables, en ninguno de los tiempos evaluados (0, 24, 48, 72 y 96 h). Debido a que no hubo diferencias entre las diferentes ratios de enfriamiento utilizadas, los valores medios de MT, MP y espermatozoides viables en todas las muestras evaluadas inmediatamente tras la refrigeración (0 h) fueron de alrededor de 85%, 68% y 88%, respectivamente. Independientemente de la ratio de enfriamiento utilizada, el tiempo de conservación a 5 °C produjo una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la calidad de las muestras. Aun así, los valores de MT, MP y espermatozoides viables a las 96 h de conservación a 5 °C se mantuvieron en valores medios del 62%, 45% y 82%, respectivamente. De modo similar, los parámetros de calidad de movimiento tampoco se vieron afectados de forma significativa por la ratio de enfriamiento. Los valores promedio de VCL, VSL, LIN y ALH para las muestras refrigeradas usando las diferentes ratios de enfriamiento, y a lo largo del periodo de conservación, fueron de  $140,5 \pm 5,3$  µm/s,  $92,3 \pm 3,8$  µm/s,  $66,5 \pm 1,8$  % y  $4,6 \pm 0,2$  µm, respectivamente .

### **Experimento 2:**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Experimento 1, en este segundo experimento se evaluó la influencia del individuo en la eficiencia del protocolo de refrigeración utilizando ratios de enfriamiento rápido.

Con este propósito, las fracciones espermáticas de los mismos cinco perros utilizados en el experimento 1 fueron procesadas y refrigeradas de forma individual utilizando en este caso la ratio de enfriamiento más rápido usada con

éxito en el experimento anterior (2,25 °C/min), así como con la ratio de enfriamiento control (0,2 °C/min). Posteriormente, las muestras fueron conservadas a 5 °C durante 96 h y la calidad espermática fue evaluada tal y como se describe en el experimento 1.

En el caso de muestras individuales, el uso de una ratio de enfriamiento rápido o lento tampoco influyó de forma significativa sobre la MT, MP ni sobre la viabilidad espermática. Únicamente, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre machos respecto a la calidad espermática a lo largo del periodo de conservación a 5 °C.



*Objetivo 2: Evaluar el efecto de una ratio de enfriamiento rápido antes de la congelación sobre la calidad del semen canino criopreservado utilizando el método Uppsala, en combinación con la adición fraccionada o no de glicerol (Artículo 2).*

### **Experimento 1:**

El objetivo de este experimento fue evaluar la calidad espermática post-descongelación tras la aplicación de una ratio de enfriamiento rápido antes del proceso de criopreservación mediante el método Uppsala. Al mismo tiempo, también se evaluó la influencia de la adición de glicerol de forma fraccionada o única a los medios de congelación durante el proceso de criopreservación empleado.

En este caso, se procesaron un total de 30 fracciones espermáticas procedentes de 6 perros (5 replicados por perro). Después del lavado mediante centrifugación, los pellets resultantes de los eyaculados de cada uno de los perros fueron agrupados en un pool. La muestra final obtenida fue dividida en cuatro alícuotas, las cuales fueron criopreservadas mediante el método Uppsala utilizando dos ratios de enfriamiento (control: 0,2 °C/min o rápido: 2,25 °C) y dos protocolos de adición de glicerol (fraccionado o no fraccionado).

Las ratios de enfriamiento utilizadas se realizaron de la misma forma descrita anteriormente. El enfriamiento del semen a una velocidad de 2,25 °C/min fue llevado a cabo mediante la inmersión directa del tubo con la muestra en un vaso con 200 mL de agua fría a 4 °C. La ratio de 0,2 °C/min se realizó usando un baño programable (modelo 9612, PolyScience, Niles, IL, USA).

Para la adición del glicerol mediante el método fraccionado, las muestras de semen fueron diluidas para la fase de enfriamiento a 5 °C en un medio con un 3% de glicerol y para la fase de congelación en un medio con un 7% de glicerol. Por otro lado, para la adición del glicerol de modo no fraccionado, se utilizó un medio sin glicerol durante la fase de enfriamiento a 5 °C y un medio con un 10% de glicerol para la congelación.

La calidad de las muestras congeladas-descongeladas se evaluó después de 30 y 150 min de incubación a 38 °C post-descongelación. Para ello fueron analizados los parámetros de motilidad y viabilidad espermática en un total de 60 pajuelas (3 pajuelas descongeladas por cada uno de los 4 tratamientos y por replicado).

Dentro de cada uno de los métodos de adición de glicerol, el uso de una ratio de enfriamiento a 5 °C rápido o lento antes de la congelación, no influyó de forma significativa en los porcentajes de MT, MP y espermatozoides viables ni a los 30 ni a los 150 min después de la descongelación.

Con respecto al protocolo de adición de glicerol, éste si influyó significativamente en los porcentajes de MT, MP y espermatozoides viables ( $P < 0,05$ ) a los 30 min tras la descongelación y en el porcentaje de espermatozoides viables ( $P < 0,05$ ) a los 150 min tras la descongelación, en las muestras criopreservadas utilizando una ratio de enfriamiento lento. Los valores de MT, MP y espermatozoides viables fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) en las muestras criopreservadas utilizando el método no fraccionado de adición de glicerol, en comparación con el fraccionado.

Los parámetros de calidad de movimiento no se vieron influidos ni por la ratio de enfriamiento ni por el protocolo de adición de glicerol.

### **Experimento 2:**

En base a los resultados obtenidos en el experimento 1, en este segundo experimento, se evaluó la respuesta individual al protocolo de criopreservación mediante el método Uppsala empleando una ratio de enfriamiento rápido en combinación a la adición fraccionada o no de glicerol. Para ello se procesaron un total de 20 fracciones espermáticas procedentes de eyaculados de cuatro perros (5 replicados por perro), las cuales se criopreservaron de forma individual utilizando las mismas ratios de enfriamiento y métodos de adición de glicerol descritos en el experimento 1.

La calidad espermática fue evaluada de igual forma que la descrita en el experimento 1. Se analizaron un total de 30 pajuelas para cada macho (3 pajuelas descongeladas por cada uno de los tratamientos y por replicado).

Se observaron diferencias significativas entre machos ( $P < 0,01$ ) en los porcentajes de MT, MP y espermatozoides viables a los 30 min tras la descongelación y en el porcentaje de espermatozoides viables a los 150 min tras la descongelación.

La ratio de enfriamiento no influyó significativamente los porcentajes de MT, MP y espermatozoides viables en ninguno de los tiempos de incubación tras la descongelación, siendo por tanto, la interacción macho x ratio de enfriamiento no significativa.

**Objetivo 3:** *Optimizar las concentraciones de Hoechst 33342 para la identificación y separación de los espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo y determinar si existen variaciones entre individuos que afecten al proceso de separación espermática en la especie canina (Artículo 3).*

En este experimento fueron procesadas 18 fracciones espermáticas procedentes de seis perros (3 muestras por perro). Tras la recogida de las muestras, las fracciones espermáticas fueron centrifugadas y procesadas para la separación de los espermatozoides mediante citometría de flujo. Para ello, los pellets resultantes de cada macho fueron diluidos con medio TCF y divididos en cuatro alícuotas de 1 mL, conteniendo cada una de ellas  $100 \times 10^6$  espermatozoides. Cada alícuota resultante se tiñó con una concentración creciente de H-42: 5; 7,5; 10 y 12,5  $\mu\text{L}$  de una solución stock de H-42 (5 mg/mL; peso/vol en agua bidestilada), resultando en cuatro grupos experimentales por eyaculado.

Los porcentajes de MT, espermatozoides viables y espermatozoides con acrosomas dañados y/o reaccionados, fueron evaluados en semen fresco (centrifugado y analizado antes del proceso de tinción), en espermatozoides inmediatamente sometidos al proceso de separación (AS; evaluados a una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL) y tras ser sometidos a una centrifugación para su concentración después del proceso de separación (AC; evaluados a una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL).

La capacidad de las muestras para mostrar de forma definida las poblaciones espermáticas X e Y, la cual permite una correcta identificación y separación de estas mediante citometría de flujo, se vió influenciada significativamente ( $P < 0,01$ ) por la concentración de H-42 utilizada, pero no por el macho donante. Las poblaciones de espermatozoides portadores de un cromosoma X o Y se identificaron correctamente solo en un 77,5% de las muestras teñidas con 5  $\mu\text{L}$  de H-42, mientras que estas dos poblaciones pudieron ser

identificadas claramente en el 100% de las muestras teñidas con 7,5, 10 y 12,5  $\mu\text{L}$  de H-42.

Debido a que la tinción de 5  $\mu\text{L}$  de H-42 fue significativamente menos eficiente ( $P < 0,05$ ) a la hora de la identificación de las poblaciones espermáticas X e Y que el resto de concentraciones estudiadas, solamente se evaluaron los valores de los parámetros de calidad del proceso de separación correspondientes a las muestras teñidas con las concentraciones más altas de H-42 (7,5; 10 y 12  $\mu\text{L}$  de H-42). Los porcentajes de espermatozoides FDA+ (no viables), correctamente orientados y separados, así como la velocidad de separación se vieron influidos significativamente por el individuo ( $P < 0,01$ ) pero no por la concentración de H-42 utilizada. Los porcentajes de espermatozoides correctamente orientados oscilaron en rangos situados entre un 26,1 y un 45%. La velocidad de separación obtenida se mantuvo en un rango de 3100 a 4600 espermatozoides por segundo en todas las muestras analizadas.

En relación a parámetros de calidad espermática, tanto en espermatozoides frescos como en separados, los valores de MT y porcentaje de espermatozoides viables fueron similares y estuvieron en torno al 85 y 90%, respectivamente. Sin embargo, tanto la MT como el porcentaje de espermatozoides viables se vieron afectados de forma negativa ( $P < 0,01$ ) por la centrifugación realizada inmediatamente después del proceso de separación espermática, situándose dichos porcentajes en rangos de valores entre 61-72% para la MT y entre 69-75% para el porcentaje de espermatozoides viables

# CONCLUSIONES



1. Una ratio de enfriamiento rápido de 2,25 °C/min puede ser utilizada de forma eficiente en protocolos para la refrigeración de semen canino, utilizando un medio tris fructosa con un 20% de yema de huevo, consiguiendo valores óptimos de calidad espermática durante largos periodos de conservación a 5 ° C (96 h).
2. Los espermatozoides caninos pueden ser criopreservados mediante el método Uppsala con una adición fraccionada o no de glicerol, utilizando una ratio de enfriamiento rápido de 2,25 °C/min antes de la congelación.
3. La separación de espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo puede realizarse con éxito en la especie canina utilizando entre 7,5 y 12,5 µL de Hoechst 33342. Además, diferencias entre individuos pueden afectar significativamente a la eficiencia del proceso de separación.





REFERENCES  
REFERENCIAS



- Batista M, Santana M, Alamao D, González F, Niño T, Cabrera F, Gracia A, 2012. Effects of incubation temperature and semen pooling on the viability of fresh, chilled and freeze-thawed canine semen samples. *Reprod Dom Anim* 47, 1049-1055.
- Behr B, Rath D, Mueller P, Hildbrandt TB, Goeritz F, Braun BC, Leahy T, Graaf SP, Maxwell WMC, Hermes R, 2009: Feasibility of sex-sorting sperm from the white and the black rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros Bicornis*). *Theriogenology* 72, 353-364.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Muñoz O, Tainturier D, 2010. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (low density lipoproteing). *Anim Reprod Sci* 119, 305-313.
- Clulow JR, Buss H, Evans G, Sieme H, Rath D, Morris LH, Maxwell WMC, 2012. Effect of staining and freezing media on sortability of stallion spermatozoa and their post-thaw viability after sex-sorting and cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 47, 1-7.
- Del Olmo D, Parrilla I, Gil MA, Maside C, Tarantini T, Angel MA, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM, 2013. Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 80, 350-356.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM, 2010. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 45, 214-220.
- Garner DL and Seidel Jr GE, 2003. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Can J Anim Sci* 83, 375-384.

- Garner DL, 2006. Flow Cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65, 943-957.
- Hermansson U, Linde-Forsberg C, 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65, 584-593.
- Hermes R, Behr B, Hildebrandt TB, Blottner S, Sieg B, Frenzel A, Knieriem A, Saragusty J, Rath D, 2009. Sperm sex-sorting in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Anim Reprod Sci* 112, 390-396.
- Kmenta I, Strohmayer C, Müller-Schlöser F, Schäfer-Somi S, 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology* 75, 1095-1103.
- Kutzler MA, 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64, 747-754.
- Lu Y, Zhang M, Lu S, Xu D, Huang W, Meng B, Xu H, Lu K, 2010. Sex-preselected buffalo (*Bubalus bubalis*) calves derived from artificial insemination with sexed sperm. *Anim Reprod Sci* 119, 169-171.
- Martínez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martínez EA, Roca J, 2012. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PloS One* 7 (5).
- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, de Graaf SP, Eriksson B, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK, 2004. Integration of sperm sexing into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci* 82-83, 79-95.
- Meyers MA, Burns G, Am D, Schenk JL, 2008. 266 Birth of canine offspring following insemination of a bitch with flow-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 20, 213 (Abstract).
- Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscós CM, 2010. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation

in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 45, 201-207.

Morris LHA, Hollinshead F, Evans G, Maxwell WMC, 2003. The longevity and acrosome status of stallion flow sorted sperm. *Theriogenology* 59, 512 (abstract).

Morton KM, Rückholdt M, Evans G, Maxwell WMC, 2008. Quantification of the DNA difference, and separation of X- and Y-bearing sperm in alpacas (*Vicugna pacos*). *Reprod Dom Anim* 43, 638-642.

Neagu VR, García BM, Sandoval CS, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Fernández LG, Tapia JA, Peña FJ, 2010. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 15, 645-650.

Nizánski W, Klimowicz M, Partyka A, Savic M, Dubiel A, 2009. Effects of the inclusion of Equex STM into tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5°C. *Reprod Dom Anim* 44, 363-365.

Nöthling JO, Shuttleworth R, 2005. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 63, 1469-1480.

O'Brien JK, Stojanow T, Heffernan SJ, Hollinshead FK, Vogelnest L, Maxwell WMC, Evans G, 2005. Flow cytometric sorting of non-human primate sperm nuclei. *Theriogenology* 65, 246-259.

O'Brien JK and Robeck TR, 2006. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex pre-selection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reprod Fertil Dev* 18, 319-339.

Oi Maya, Yamada K, Hayakawa H, Suzuki H, 2013. Sexing of dog sperm by fluorescence in situ hybridization. *Reprod Dev* 59, 92-96.

- Okano T, Murase T, Asano M, Tsubota T, 2004. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J Vet Sci* 66, 1359-1364.
- Parks JE and Graham JK, 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222
- Peña FJ, Núñez-Martínez I, Mórán JM, 2006. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod Dom Anim* 41, 21-29.
- Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG, 2012. Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. *Anim Reprod Sci* 133, 214-223.
- Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde-Forsberg C, 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 57, 1669-1681.
- Pope CE, Crichton EG, Gómez MC, Dumas C, Dresser BL, 2009. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow-sorted sperm. *Theriogenology* 71, 864-871.
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M, 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycerol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1848-1858.
- Shäfer-Somi, S. Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C, 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66, 173-182.
- Spinaci M, Merlo B, Zannoni A, Iacono E, De Ambrogi M, Turma ME, Zambelli D, 2007. In vitro production of cat blastocysts of predetermined sex using flow cytometrically sorted semen. *Theriogenology* 67, 872-877.

Thomassen R, Farstad W, 2009. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology* 71, 190-199.

Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61, 481-492.

White IG, 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5, 639-658.







# ARTICLE 1

**THERIOGENOLOGY**  
An International Journal of  
ANIMAL REPRODUCTION

Quality of chilled and cold-stored (5 °C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates.



## Quality of chilled and cold-stored (5 °C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates.

### REVISTA:

Theriogenology

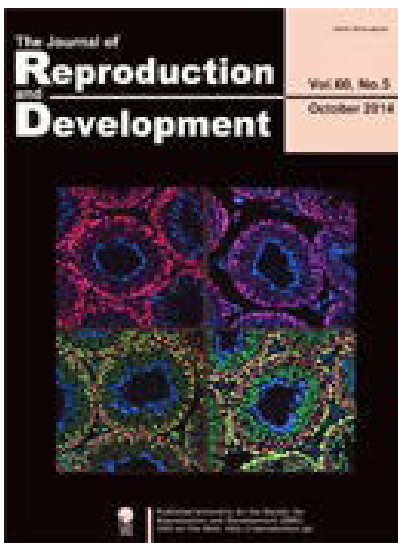
### RESUMEN:

The aim of this study was to evaluate the sperm quality in chilled canine semen using different cooling rates from room temperature (23 °C) to 5 °C and subsequently cold-stored at 5 °C for up to 96 hours. In experiment 1, semen samples from five dogs were pooled, diluted in Tris-fructose-citrate extender with 20% egg yolk and split into four aliquots that were chilled to 5 °C using different cooling rates of 2.25, 0.9, 0.45, and 0.2 (control) °C/min. In experiment 2, semen from five dogs was processed individually as described above and split into two aliquots that were chilled to 5 °C using rates of either 2.25 °C/min or 0.2 °C/min. In both experiments, the sperm quality (i.e., sperm motility and viability) was evaluated before cooling and after 0, 24, 48, 72, and 96 hours of storage at 5 °C. The total motility, progressive motility, and quality of movement parameters were assessed using computer-assisted analysis system, and the percentage of viable spermatozoa was determined using flow cytometry (H-42/PI//FITC-PNA). The cooling rate did not influence the sperm quality parameters at any of the evaluation times. All evaluated males showed the same response to chilling semen at a rapid cooling rate. Storage time negatively influenced ( $P < 0.05$ ) sperm motility, regardless of the cooling rate used. In conclusion, canine sperm could be chilled and stored for 96 hours at 5 °C in a Tris-fructose extender with 20% egg yolk using rapid cooling rates, with values for sperm quality similar to those from a conventional protocol.

### DIRECCIÓN URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14002611>





# ARTICLE 2

The Journal of  
**Reproduction and Development**

Effects of rapid cooling prior to freezing on the quality of canine cryopreserved spermatozoa.



## **Effects of rapid cooling prior to freezing on the quality of canine cryopreserved spermatozoa.**

### **REVISTA:**

The Journal of Reproduction and Development

### **RESUMEN:**

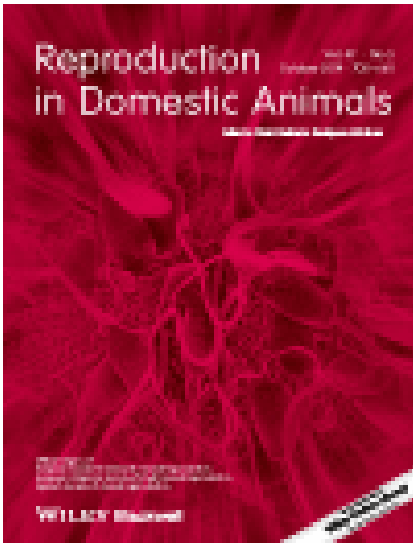
The aim of this study was to evaluate the effects of rapid cooling prior to freezing on frozen-thawed canine sperm quality. In experiment 1, centrifuged ejaculates from 6 dogs were pooled, split into 4 aliquots and cryopreserved by the Uppsala procedure using different cooling rates (control, cooling speed 18 C/90 min and average cooling rate 0.2 C/min; rapid, cooling speed 18 C/8 min and average cooling rate 2.25 C/min) in combination with 2 glycerol addition protocols (fractionated or unfractionated). In experiment 2, centrifuged ejaculates from 4 dogs were processed individually using the same cooling rates described in experiment 1 in combination with an unfractionated glycerol addition protocol. Each of the experiments was replicated 5 times. Sperm quality was evaluated after 30 and 150 min of post-thawing incubation at 38 C. Total motility (TM), progressive motility (PM) and quality of movement parameters were assessed using a computerized system, and sperm viability (spermatozoa with intact plasma and acrosome membranes) was assessed using flow cytometry (H-42/PI/FITC-PNA). Values for TM, PM, viable spermatozoa and the quality of movement parameters after thawing were not significantly affected by the cooling rate. The interaction between the cooling rate and the added glycerol protocol was not significant. There were significant differences among the males ( $P < 0.01$ ) in the sperm quality parameters evaluated after thawing. The interaction between the males and the cooling rate was not significant. In conclusion, canine spermatozoa can be cryopreserved using the Uppsala method at an average cooling rate of 2.25 C/min prior to freezing together with addition of fractionated or unfractionated glycerol.

### **DIRECCIÓN URL:**

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/5/60\\_2014-024/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/5/60_2014-024/_article)







# ARTICLE 3

Reproduction  
in Domestic Animals

**The effects of Hoechst 33342 staining and the male sample donor on the sorting efficiency of canine spermatozoa.**



## The effects of Hoechst 33342 staining and the male samples donor on the sorting efficiency of canine spermatozoa.

### REVISTA:

Reproduction in Domestic Animals

### RESUMEN:

The aim of this study was to evaluate the influence of Hoechst 33342 (H-42) concentration and of the male donor on the efficiency of sex-sorting procedure in canine spermatozoa. Semen samples from six dogs (three ejaculates/dog) were diluted to  $100 \times 10^6$  sperm/mL, split into four aliquots, stained with increasing H-42 concentrations (5, 7.5, 10 and 12.5  $\mu$ L, respectively) and sorted by flow cytometry. The rates of non-viable (FDA+), oriented (OS) and selected spermatozoa (SS), as well as the average sorting rates (SR, sorted spermatozoa/s), were used to determine the sorting efficiency. The effects of the sorting procedure on the quality of sorted spermatozoa were evaluated in terms of total motility (TM), percentage of viable spermatozoa (spermatozoa with membrane and acrosomal integrity) and percentage of spermatozoa with reacted/damaged acrosomes. X- and Y-chromosome-bearing sperm populations were identified in all of the samples stained with 7.5, 10 and 12.5  $\mu$ L of H-42, while these two populations were only identified in 77.5% of samples stained with 5  $\mu$ L. The values of OS, SS and SR were influenced by the male donor ( $P < 0.01$ ) but not by the H-42 concentration used. The quality of sorted sperm samples immediately after sorting was similar to that of fresh samples, while centrifugation resulted in significant reduction ( $P < 0.05$ ) in TM and in the percentage of viable spermatozoa and a significant increase ( $P < 0.01$ ) in the percentage of spermatozoa with damage/reacted acrosomes. In conclusion, the sex-sorting of canine spermatozoa by flow cytometry can be performed successfully using H-42 concentrations between 7.5 and 12.5  $\mu$ L. The efficiency of the sorting procedure varies based on the dog from which the sperm sample derives.

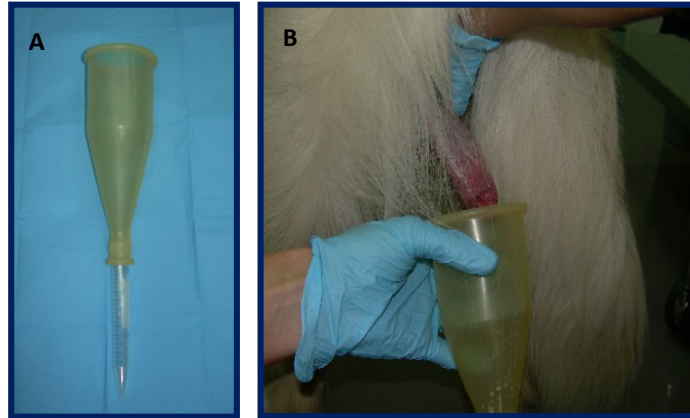
### DIRECCIÓN URL:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12238/abstract;jsessionid=DBFF72760F82D9EC24B75D4B70FA52D2.f03t02>

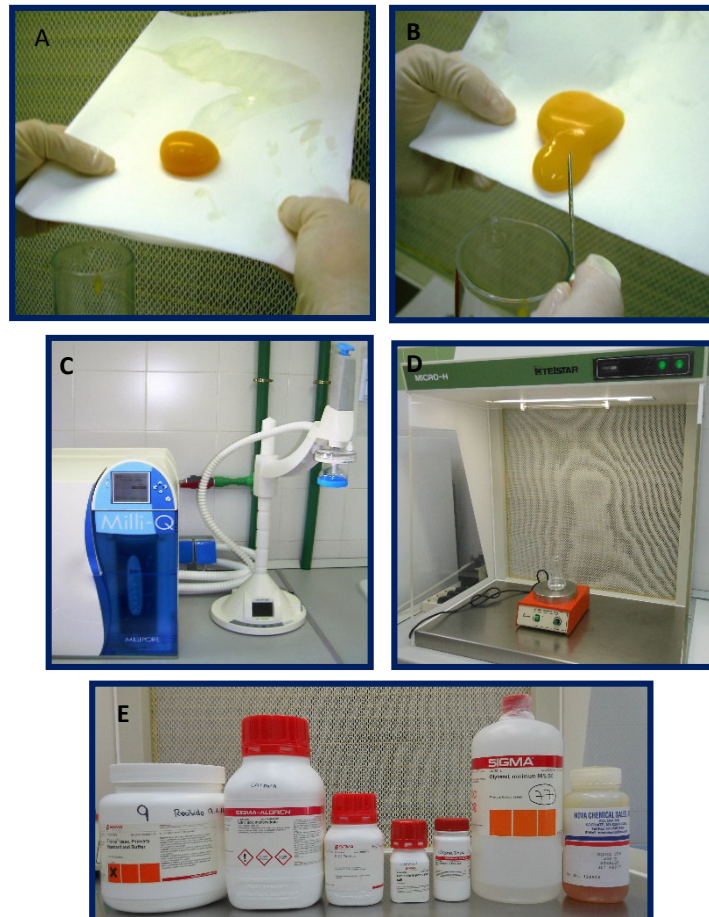


GRAPHIX APPENDIX  
APÉNDICE GRÁFICO





**Figure 1. Canine semen collection.** A-B: Extraction of ejaculates by digital manipulation into calibrated 15 mL conical tubes.

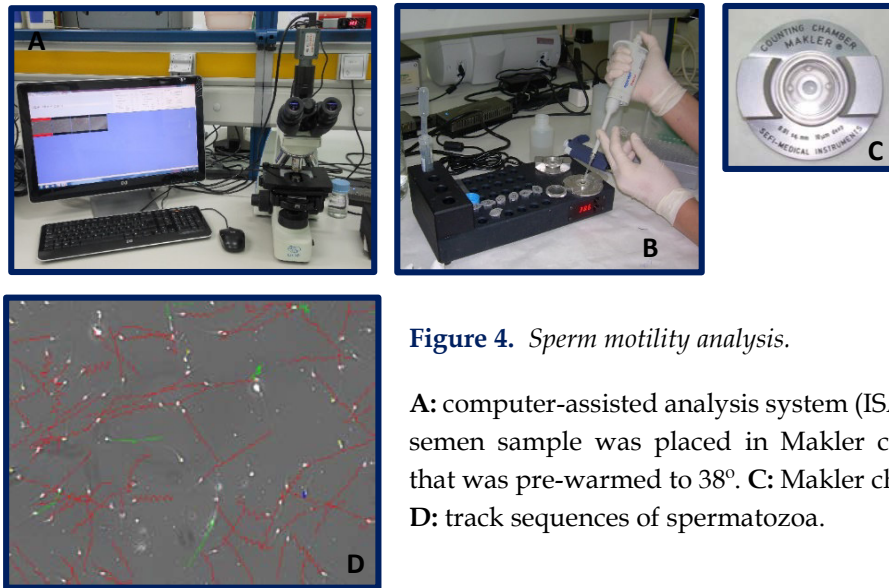


**Figure 2. Preparation of extenders for semen chilling and cryopreservation.** A-B: Egg yolk manipulation. C: Milli-Q water Synthesis System. D: laminar flow hood. E: chemical used for chilling and freezing extenders.



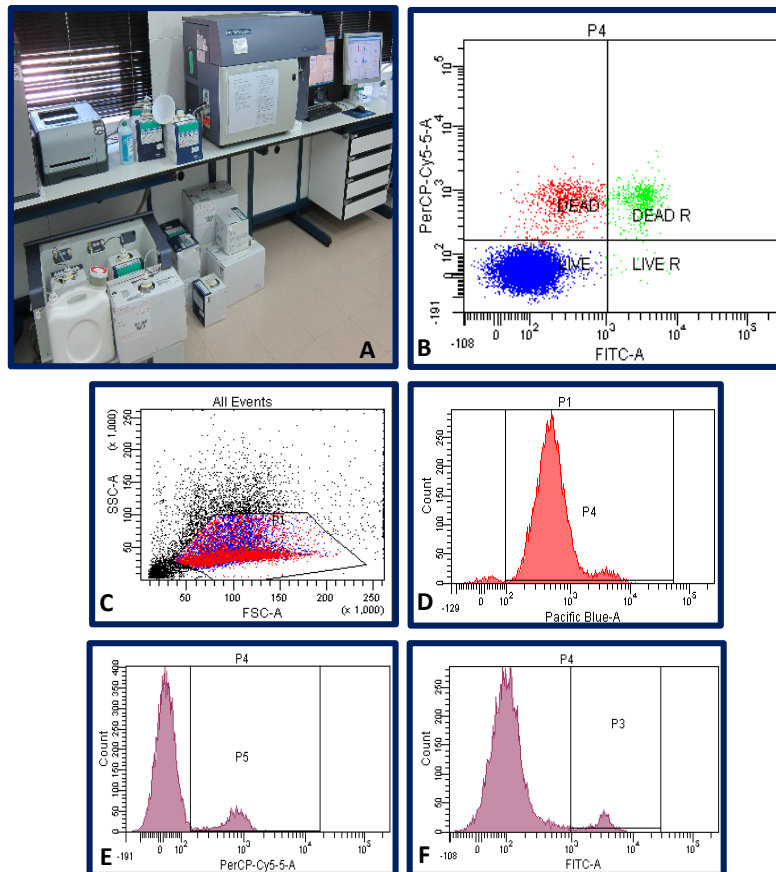


**Figure 3. Chilling and cryopreservation procedures.** **A:** centrifugation step. **B:** SP-100 NucleoCounter used to determine sperm concentration. **C:** Cool water at 5 °C for rapid cooling. **D:** temperature controlled water bath for slow cooling. **E:** room for cold-storage at 5 °C. **F:** thermal cabinet for semen manipulation at 5 °C. **G:** filling of the straws. **H:** sealing of straws. **I:** freezing unit. **J:** exposure of straws to liquid N<sub>2</sub> vapours. **K:** storage in liquid N<sub>2</sub>. **L:** thawing of straws at 70 °C in a water bath.



**Figure 4.** Sperm motility analysis.

**A:** computer-assisted analysis system (ISAS®). **B:** semen sample was placed in Makler chamber that was pre-warmed to 38°. **C:** Makler chamber. **D:** track sequences of spermatozoa.

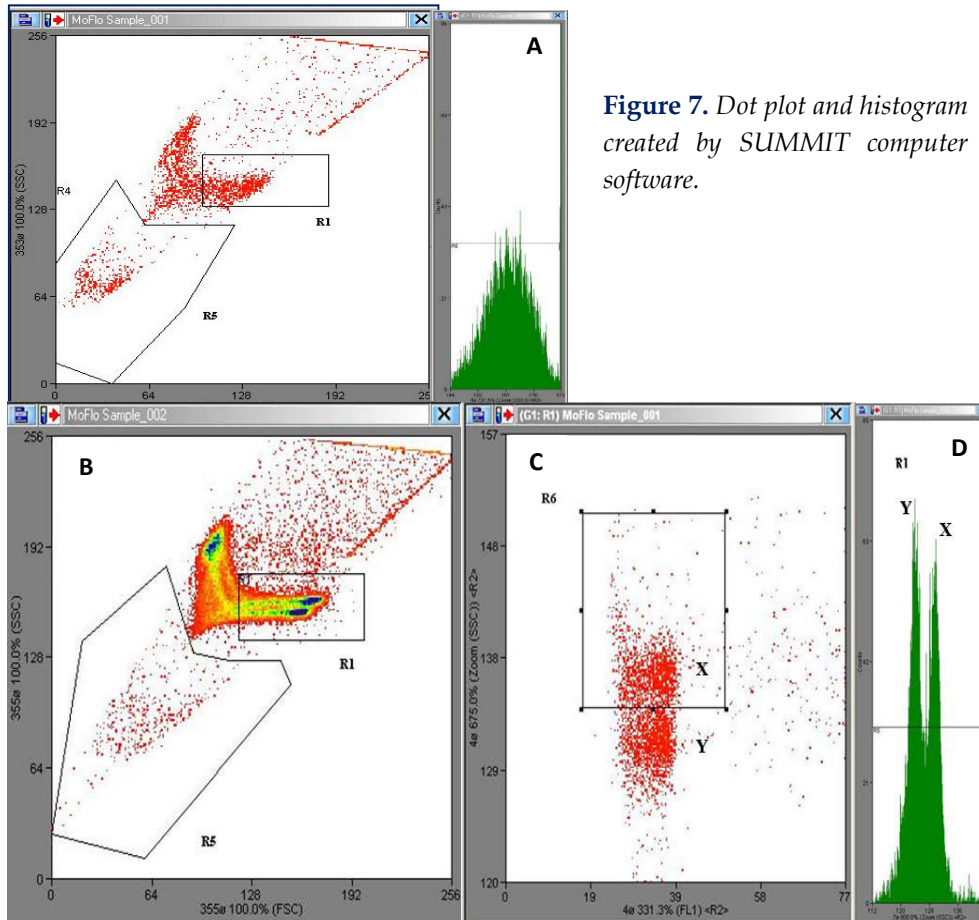


**Figure 5.** Cytometric assessment of sperm viability using a triple-fluorescence procedure.

**A:** Flow cytometer (BD® FACS CANTO II). **B-F:** Flow cytometric dotplot and histogram outputs in semen samples stained with H-42, IP and PNA-FICT. P4 population represented all events stained with H-42, P5 represented IP+ sperm population and P3 represented PNA-FICT+ sperm population.



**Figure 6.** *Flow cytometric sperm sex sorting.* **A:** incubation of spermatozoa with H-42 in a water bath at 36 °C in the dark. **B:** MoFlo SX® flow cytometer/sperm sorter. **C:** sample stained with H-42 and FDA for sex sorting. **D:** ultraviolet laser impact on the sperm sample. **E:** charged deflection plates and X-chromosome-bearing sperm population collection.



**Figure 7.** Dot plot and histogram created by SUMMIT computer software.

**A:** Flow cytometric dotplot and histogram outputs in a 5  $\mu$ L H-42 sample. Identification of X- and Y-sperm populations is not possible. **B-D:** Flow cytometric dot plots and histogram outputs showing fluorescence signals generated by canine spermatozoa from a 10  $\mu$ L H-42 sample. X- and Y-chromosome bearing spermatozoa are clearly identifiable. **R1** region represent correctly orientated sperm, **R5** region represented sperm that incorporate food-dye (FDA +; non viable sperm) and **R6** region represent X sperm sorted population.



ABBREVIATIONS  
ABREVIATURAS



**AI: Artificial Insemination.**

**H-42: Hoechst 33342.**

**TCF-Ext: Tris citrate fructose extender.**

**EY: Egg yolk.**

**PBS: Phosphate-buffered saline**

**SRFs: Sperm rich fractions.**

**C-Ext: Cooling extender.**

**F-Ext: Freezing extender.**

**FDA: Food colouring dye.**

**OS: Oriented spermatozoa.**

**SS: Selected spermatozoa.**

**SR: Sorting rates.**

**TM: Total Motility.**

**PM: Progressive motility.**

**VAP: Average path motility.**

**VCL: Curvilinear motility.**

**VSL: Straight line velocity.**

**LIN: Linear coefficient.**

**ALH: Amplitude of lateral head displacement.**

**PI: Propidium Iodide.**

**FICT-PNA: Fluorescein-conjugated peanut agglutinin.**





APPENDIX  
APÉNDICE



# Appendix

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports<sup>®</sup>

## MARKED JOURNAL LIST

Abbreviated Journal Title	ISSN	2013 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2013 Articles	Cited Half-life	<i>Eigenfactor</i> <sup>®</sup> Score	<i>Article Influence</i> <sup>®</sup> Score
J REPROD DEVELOP	0916-8818	1652	1.635	1.693	0.191	89	5.5	0.00403	0.471
REPROD DOMEST ANIM	0936-6768	2828	1.177	1.442	0.202	178	4.9	0.00825	0.394
THERIOGENOLOGY	0093-691X	12505	1.845	2.146	0.369	309	8.5	0.01576	0.534

