

Evaluación de diluyentes para la refrigeración de semen de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Evaluation of extenders for the cooling of rabbit semen (*Oryctolagus cuniculus*)

Camila Suárez A.¹, Aarón Sierra P.¹, David Restrepo M.¹,
Juan E. Duque C.², Giovanni Restrepo B.^{1,3}

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de diferentes diluyentes para la refrigeración de semen de conejo y su efecto sobre la calidad espermática. Se utilizaron 30 muestras de semen de 10 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) sexualmente maduros. Cada muestra se diluyó separadamente en proporción 1:10 en cuatro diluyentes, compuestos por leche descremada y azúcares (T1); dextrosa, citrato sódico y acetato potásico (T2); caseinatos de sodio, fosfatos y azúcares (T3); y tris-ácido cítrico y yema de huevo (T4). El semen se mantuvo a 16 °C durante 72 horas. Al momento de la dilución y cada 24 horas se evaluó la movilidad total (MT), la movilidad progresiva (MP) y la cinética espermática con el sistema Sperm Class Analyzer®, y la viabilidad y la morfología mediante la tinción con eosina-nigrosina. El análisis estadístico se realizó mediante modelos mixtos y la comparación de medias por la prueba de Duncan. Al momento de la dilución (0 h), se observó una MT inferior para T2 y T4 en comparación con T1 y T3 ($p<0.05$). Este mismo efecto se observó a las 24 h de refrigeración, mientras a las 48 h la MT fue inferior para T2, respecto a T1, T3 y T4 ($p<0.05$). La MP fue igualmente superior para T1 y T3 a las 0, 24 y 48 h ($p<0.05$). Se halló un descenso en la morfología normal a las 72 h para T4 ($p<0.05$). Se observó una mayor conservación de la viabilidad en el tiempo para T1 y T3 ($p<0.05$). Se concluye que los diluyentes compuestos por leche descremada o caseinatos con azúcares protegen de forma más eficiente los espermatozoides de conejo conservados mediante refrigeración.

Palabras clave: calidad seminal, conservación, movilidad, viabilidad

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

² Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia

³ E-mail: grestre0@unal.edu.co

Recibido: 9 de septiembre de 2019

Aceptado para publicación: 12 de mayo de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the use of different extenders for cooling of rabbit semen and its effect on sperm quality. Thirty semen samples from 10 sexually mature rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used. Each sample was diluted separately in a 1:10 ratio in four extenders, composed of skim milk and sugars (T1); dextrose, sodium citrate, and potassium acetate (T2); sodium caseinates, phosphates and sugars (T3); and tris-citric acid and egg yolk (T4). The semen was kept at 16 °C for 72 hours. At the time of dilution and every 24 hours, total motility (MT), progressive motility (MP) and sperm kinetics were evaluated with the Sperm Class Analyzer® system, and vitality and morphology were evaluated by the eosin-nigrosin staining. Statistical analysis was performed using mixed models and the comparison of means by the Duncan test. At the time of dilution (0 h), a lower MT for T2 and T4 was observed ($p < 0.05$). This same effect at 24 h of cooling was observed, while at 48 h the MT was lower for T2, compared to T1, T3 and T4 ($p < 0.05$). The MP was equally higher for T1 and T3 at 0, 24 and 48 h ($p < 0.05$). A decrease in normal morphology at 72 h for T4 was found ($p < 0.05$). Greater preservation of the viability over time for T1 and T3 was observed ($p < 0.05$). It is concluded that the extenders composed by skim milk or caseinates, and sugars, protect more efficiently the rabbit semen preserved by refrigeration.

Key words: seminal quality, conservation, motility, viability

INTRODUCCIÓN

El aumento en la demanda comercial de carne de conejo a nivel mundial ha llevado a muchos criadores a establecer la inseminación artificial como el método más eficiente para el manejo reproductivo (Rosato y Iaffaldano, 2011). El éxito de la inseminación artificial está estrechamente relacionado con el uso de diluyentes que mantengan la viabilidad de los espermatozoides (Kaka *et al.*, 2015). Por esta razón, ha sido indispensable establecer protocolos de conservación de semen, así como reconocer los diluyentes más adecuados para preservar las características seminales (Di Iorio *et al.*, 2014; Johnke *et al.*, 2014).

Las temperaturas usadas en los procesos de refrigeración de semen de conejo han sido muy variables, desde 4 °C (Aksoy *et al.*, 2010) y 5 °C (Di Iorio *et al.*, 2014; Mocé y Vicente, 2002) hasta 15 °C (López-Gatius *et al.*, 2005; Roca *et al.*, 2000) y 18 °C (Lopez y Alvarino, 1998). Así mismo, se han utilizado tiempos máximos de refrigeración, desde

72 h (Di Iorio *et al.*, 2014) y 96 h (Aksoy *et al.*, 2010), hasta tiempos tan prolongados como 240 h (López-Gatius *et al.*, 2005).

Aunque los componentes de los diluyentes para la criopreservación de semen son bastante similares entre especies, los espermatozoides presentan peculiaridades propias de las especies que se requiere optimizar los diluyentes para cada especie en particular (Mocé y Vicente, 2009). En el conejo se agregan crioprotectores permeables a las soluciones de congelación, solas o en combinación con agentes no penetrantes, proteínas o sacarosa (Rosato y Iaffaldano, 2013). Para la congelación seminal se utilizan usualmente diluyentes a base de tris-ácido cítrico, glucosa y yema de huevo (El-Seadawy *et al.*, 2017; Lavara *et al.*, 2017) o lecitinas de soya (Nishijima *et al.*, 2015).

Para la refrigeración de semen de conejo se han evaluado diferentes formulaciones en los diluyentes, como aquellas basadas en Tris (tris-[hidroximetil] aminometano), ácido cítrico, glucosa, fructosa, HEPES (áci-

do 4- [2-hidroxiethyl] -1-piperazina-metano-sulfónico) y yema de huevo (Roca *et al.*, 2000; Aksoy *et al.*, 2010; López-Gatius *et al.*, 2005). Así mismo, se dispone de diluyentes comerciales para semen de conejo basados en dextrosa, citrato sódico y acetato potásico; sin embargo, no se encuentran estudios sobre sus implicancias en la calidad y la fertilidad del semen refrigerado.

Otras sustancias usadas en la conservación de semen son los caseinatos, los cuales han sido efectivos en garantizar la longevidad de los espermatozoides en el enfriamiento. Se conoce su efecto favorable en el mantenimiento de la movilidad espermática y la integridad de la membrana plasmática, e incluso en el incremento de algunos parámetros cinéticos del semen equino (Lagares *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2016); sin embargo, no existen reportes de su uso en el semen de conejo. Con base a esto, el objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes diluyentes para la refrigeración de semen de conejo y su efecto sobre la calidad espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de semen

Se utilizaron 10 conejos machos (*Oryctolagus cuniculus*) sexualmente maduros de la raza ruso grande, también conocido como californiano, con edades entre los 6 y 18 meses, ubicados en una producción cunícola en el municipio de Marinilla (Antioquia, Colombia) con una temperatura ambiente de 20 °C. Los animales tuvieron actividad reproductiva constante, fertilidad comprobada mediante crías nacidas vivas y eran alimentados dos veces al día con concentrado comercial. El semen fue colectado mediante una vagina artificial modelo PLQ-135 (Pledge Agro, China), la cual contenía agua aproximadamente a 42 °C y utilizando una coneja para estimular al macho durante la colecta. Se colectaron tres eyaculados por

conejo, dando un total de 30 muestras seminales. Solo los eyaculados que poseían más del 70% de espermatozoides móviles totales fueron utilizados en el experimento (Mocé *et al.*, 2010).

Dilución y Refrigeración del Semen

Cada muestra de semen se diluyó separadamente en proporción 1:10 en cuatro diluyentes (tratamientos), compuestos por: leche descremada y azúcares (T1); dextrosa, citrato sódico y acetato potásico (T2); caseinatos de sodio, fosfatos y azúcares (T3); y tris-ácido cítrico y yema de huevo (T4). El semen diluido se sometió a refrigeración a 16 °C, (basado en los trabajos de López-Gatius *et al.* [2005] y Roca *et al.* [2000]) durante tres días (72 horas), evaluándose la movilidad, la vitalidad y la morfología espermática a las 0, 24, 48 y 72 h de refrigeración.

La movilidad espermática se evaluó mediante el sistema computarizado Sperm Class Analyzer (SCA[®] v. 5.1, Microptic, España). Se utilizó un microscopio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Japón) con una cámara digital (Scout SCA780, Basler, USA). Se estableció una configuración específica para el software de: cubreobjetos de 20x20 mm, óptica en lente de ph-, gota de 7 µl, especie conejo y platina térmica a 37 °C. Se evaluó la movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), espermatozoides rápidos, amplitud lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de la cola (BCF). La morfología y la vitalidad espermática se evaluaron mediante la prueba de eosina-nigrosina (El-Seadawy *et al.*, 2017). Para esto, en un portaobjetos se mezcló una gota de semen y una gota de eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich, USA), y se realizó un extendido. La evaluación individual de 200 espermatozoides se hizo en un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon, Japón).

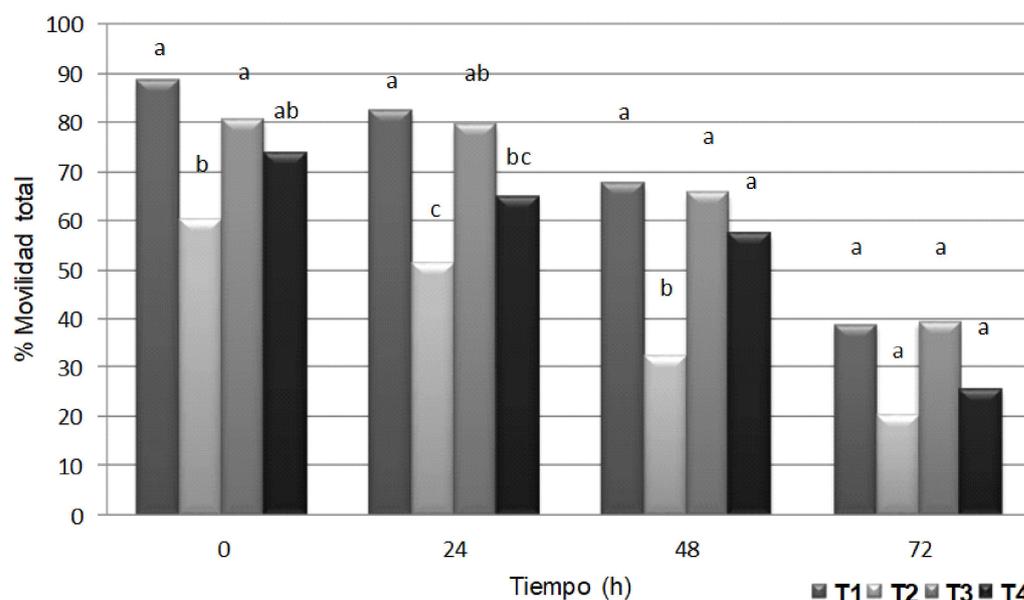


Figura 1. Movilidad total del semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes. T1: leche descremada y azúcares. T2: dextrosa, citrato sódico y acetato potásico. T3: caseinato de sodio, fosfatos y azúcares. T4: tris-ácido cítrico y yema de huevo. Letras diferentes para cada tiempo de evaluación indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el ajuste de modelos mixtos. Se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se realizó la comparación de medias por la prueba de Duncan. Se estableció un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS v. 9.2 (SAS Inst, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El almacenamiento prolongado del semen de conejo en condiciones de refrigeración causa el deterioro gradual de la calidad y de la fertilidad (Roca *et al.*, 2000; López-Gatius *et al.*, 2005; Rosato y Iaffaldano, 2013). En esta investigación se encontró un máximo deterioro de la movilidad total (Figura 1) y la movilidad progresiva (Figura 2) de

los espermatozoides con el diluyente a base de dextrosa, citrato sódico y acetato potásico (T2). Este, en las primeras 48 h tuvo una capacidad de conservación de la movilidad similar al diluyente formulado con tris-ácido cítrico y yema de huevo (T4). Por otro lado, se encontró un efecto superior para la protección de la movilidad de los diluyentes compuestos por azúcares, acompañados ya sea por leche descremada (T1) o caseinato de sodio (T3). Dicho efecto se redujo en periodos de refrigeración superiores a las 48 h. El daño de los espermatozoides durante la refrigeración ha sido descrito como un factor que limita los programas de inseminación artificial, dado el corto periodo que se puede almacenar el semen de conejo (Iaffaldano *et al.*, 2010).

Se conoce que el uso de leche descremada ultra-pasteurizada (UHT) para la dilución del semen de conejo produce valores superiores de espermatozoides móviles y con

Cuadro 1. Parámetros cinéticos del semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes.

	T/H	0 h	24 h	48 h	72 h
VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	T1	59.35 \pm 3.64 ^a	48.27 \pm 4.1 ^{ab}	40.29 \pm 8.15 ^a	23.03 \pm 7.89 ^{ab}
	T2	44.41 \pm 5.71 ^b	27.49 \pm 3.57 ^c	16.15 \pm 4.98 ^b	7.79 \pm 4.15 ^c
	T3	56.05 \pm 4.32 ^a	55.45 \pm 7.94 ^a	42.87 \pm 6.61 ^a	24.75 \pm 7.11 ^a
	T4	44.15 \pm 3.94 ^b	35.07 \pm 2.27 ^{bc}	28.36 \pm 4.53 ^{ab}	11.06 \pm 4.72 ^{bc}
VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	T1	38.86 \pm 2.67 ^a	30.05 \pm 2.51 ^a	23.45 \pm 4.36 ^a	13.67 \pm 4.66 ^a
	T2	29.71 \pm 4.6 ^b	16.33 \pm 2.66 ^b	10.86 \pm 3.72 ^b	5.38 \pm 3.18 ^a
	T3	37.32 \pm 3.75 ^{ab}	33.44 \pm 4.44 ^a	25.14 \pm 3.14 ^a	14.92 \pm 4.3 ^a
	T4	28.96 \pm 3.61 ^b	19.61 \pm 1.68 ^b	16.3 \pm 3.05 ^{ab}	5.97 \pm 2.53 ^a
VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	T1	25.3 \pm 2.38 ^a	18.45 \pm 1.65 ^{ab}	14.17 \pm 2.73 ^a	8.48 \pm 2.89 ^a
	T2	21.48 \pm 2.79 ^a	11.16 \pm 2.07 ^c	7.83 \pm 3.02 ^b	4.24 \pm 2.68 ^a
	T3	24.11 \pm 2.85 ^a	19.75 \pm 2.28 ^a	16.10 \pm 1.82 ^a	8.70 \pm 2.65 ^a
	T4	20.75 \pm 2.97 ^a	13.33 \pm 1.22 ^{bc}	11.03 \pm 2.21 ^{ab}	3.91 \pm 1.66 ^a
ALH (μm)	T1	2.73 \pm 0.09 ^a	2.65 \pm 0.13 ^a	2.29 \pm 0.43 ^a	1.37 \pm 0.46 ^a
	T2	2.23 \pm 0.15 ^b	2.09 \pm 0.19 ^b	0.94 \pm 0.29 ^b	0.4 \pm 0.24 ^b
	T3	2.78 \pm 0.09 ^a	2.69 \pm 0.21 ^a	2.23 \pm 0.35 ^a	1.23 \pm 0.43 ^a
	T4	2.43 \pm 0.12 ^{ab}	2.3 \pm 0.09 ^{ab}	1.92 \pm 0.24 ^a	0.83 \pm 0.34 ^{ab}
BCF (Hz)	T1	6.58 \pm 0.22 ^a	5.91 \pm 0.36 ^b	4.78 \pm 0.86 ^a	3.08 \pm 1.03 ^a
	T2	7.31 \pm 0.66 ^a	5.68 \pm 0.83 ^b	2.82 \pm 0.95 ^b	1.38 \pm 0.73 ^a
	T3	6.72 \pm 0.27 ^a	6.52 \pm 0.41 ^{ab}	5.72 \pm 0.68 ^a	3.08 \pm 1.03 ^a
	T4	7.26 \pm 0.64 ^a	7.61 \pm 0.61 ^a	5.89 \pm 0.74 ^a	2.43 \pm 1.02 ^a

T1: leche descremada y azúcares, T2: dextrosa, citrato sódico y acetato potásico, T3: caseinato de sodio, fosfatos y azúcares, T4: tris-ácido cítrico y yema de huevo

Letras diferentes para cada parámetro y tiempo de evaluación indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

membrana plasmática intacta y funcional, así como mayor número de embriones recuperados después de la inseminación, en comparación con un diluyente basado en tris-ácido cítrico y glucosa (Hozbor *et al.*, 2016). Esto coincide con lo observado en el presente estudio, donde los diluyentes con leche descremada (T1) o caseinato de sodio (T3) mostraron mejores resultados durante la refrigeración, no solo en la movilidad, sino también en la proporción de espermatozoides rápidos (Figura 3), en algunos parámetros

cinéticos (Cuadro 1) y en la proporción de espermatozoides viables o con membrana intacta (Figura 4). Esto podría ser explicado por el aporte antioxidante de la leche descremada, dado que se ha reportado su capacidad para compensar la pérdida de la protección antioxidante no enzimática del semen (Filho *et al.*, 2009).

Por otra parte, un problema importante de los diluyentes de semen a base de leche o yema de huevo es el hecho que estos pro-

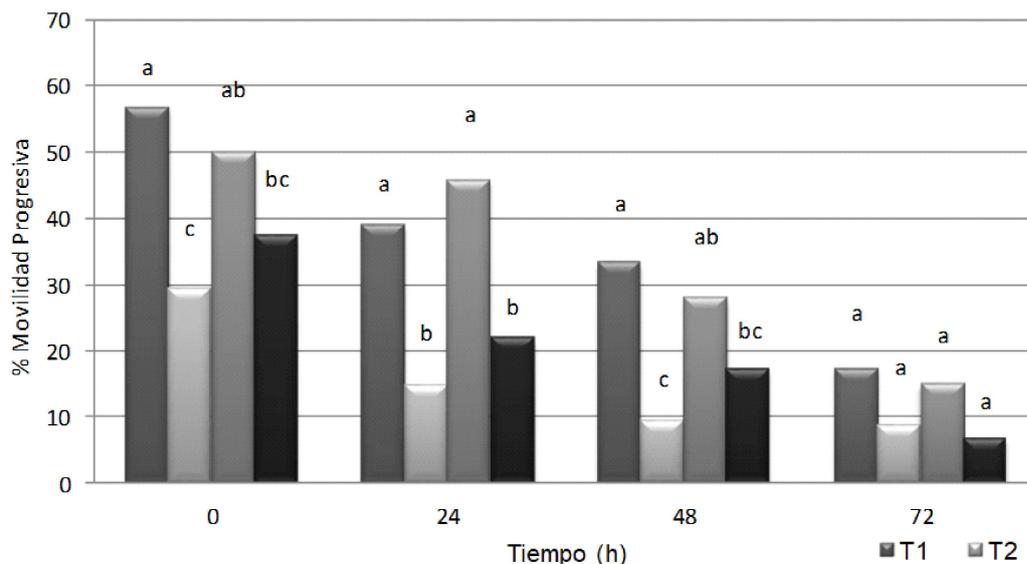


Figura 2. Movilidad progresiva del semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes. T1: leche descremada y azúcares. T2: dextrosa, citrato sódico y acetato potásico. T3: caseinato de sodio, fosfatos y azúcares. T4: tris-ácido cítrico y yema de huevo. Letras diferentes para cada tiempo de evaluación indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

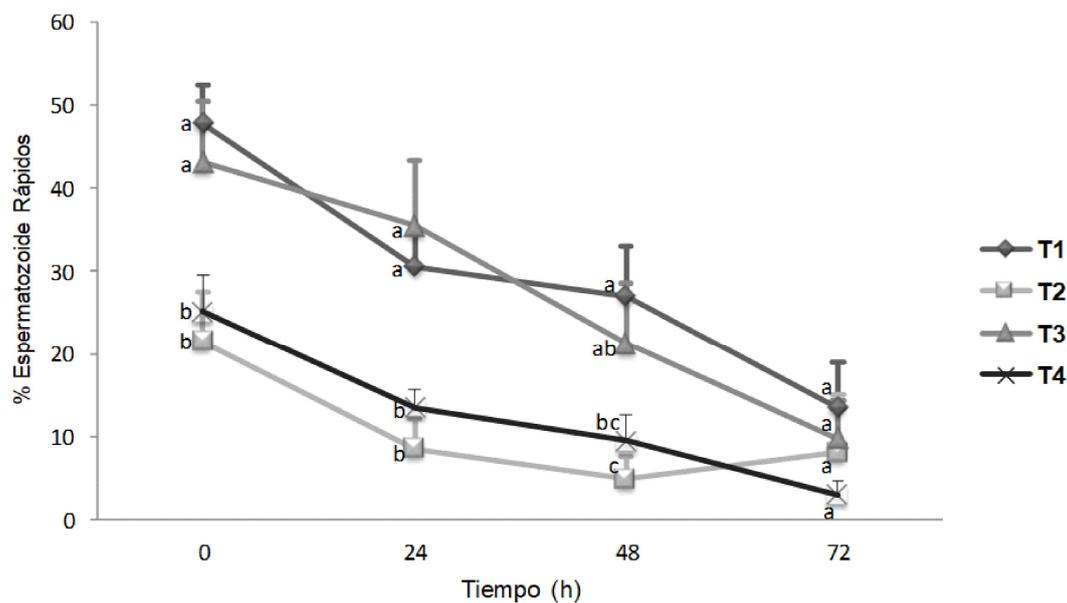


Figura 3. Espermatozoides rápidos en el semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes. T1: leche descremada y azúcares. T2: dextrosa, citrato sódico y acetato potásico. T3: caseinato de sodio, fosfatos y azúcares. T4: tris-ácido cítrico y yema de huevo. Letras diferentes para cada tiempo de evaluación (verticales) indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

Diluyentes para semen de conejo

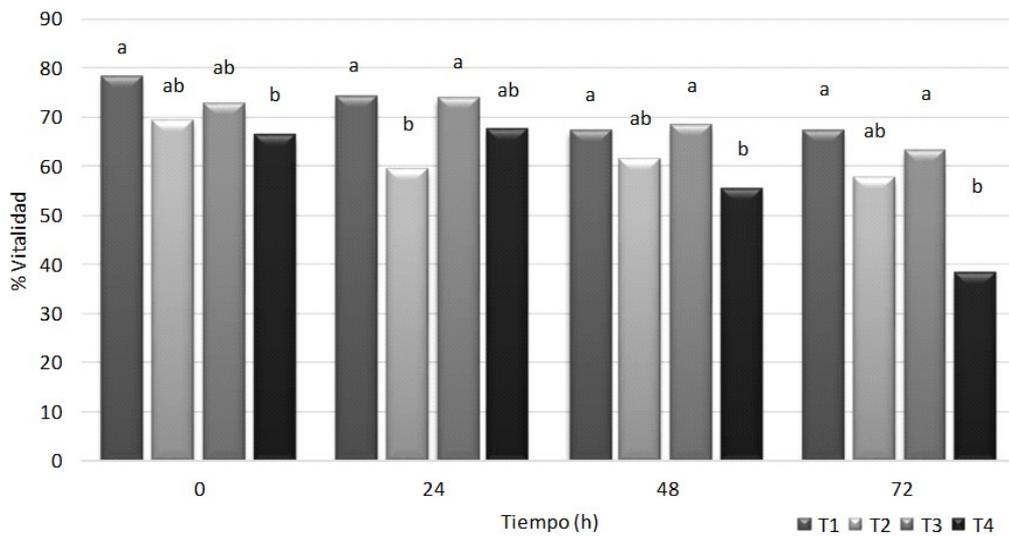


Figura 4. Vitalidad espermática del semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes. T1: leche descremada y azúcares. T2: dextrosa, citrato sódico y acetato potásico. T3: caseinato de sodio, fosfatos y azúcares. T4: tris-ácido cítrico y yema de huevo. Letras diferentes para cada tiempo de evaluación indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

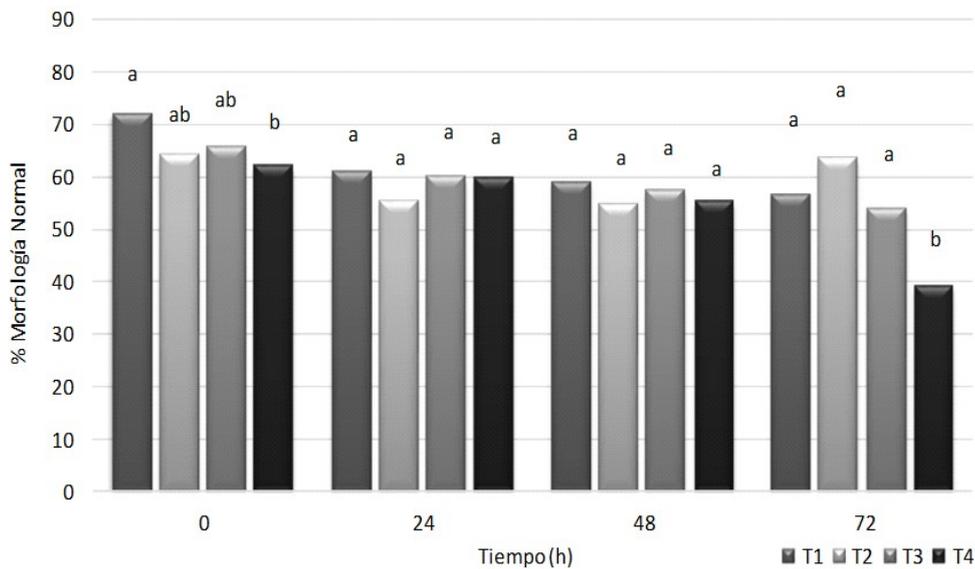


Figura 5. Morfología espermática del semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes. T1: leche descremada y azúcares. T2: dextrosa, citrato sódico y acetato potásico. T3: caseinato de sodio, fosfatos y azúcares. T4: tris-ácido cítrico y yema de huevo. Letras diferentes para cada tiempo de evaluación indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

ductos biológicos consisten en una variedad de sustancias, las cuales pueden variar entre lotes y, además, pueden incluir fracciones tanto con efectos beneficiosos como perjudiciales sobre la función espermática (Pagl *et al.*, 2006). Esto puede justificar el uso de proteínas definidas o fracciones proteicas purificadas, que para el caso de esta investigación, con el uso de caseinato de sodio (T3), permitieron niveles de protección espermática equivalentes al uso de leche descremada (T1). Estos resultados coinciden con reportes que demuestran que las fracciones de proteína de leche purificada pueden ser tan efectivas para preservar la fertilidad del semen refrigerado como los diluyentes que contienen leche descremada (Pagl *et al.*, 2006; Lagares *et al.*, 2012).

En el presente estudio fue evidente el efecto de la composición del diluyente sobre la cinética espermática. Se sabe que los diluyentes juegan un papel clave en el almacenamiento de semen de conejo, al proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico, así como para el control del pH y la presión osmótica del medio, haciendo que se reduzcan los cambios perjudiciales sobre los espermatozoides (Di Iorio *et al.*, 2014). Por otro lado, se sabe que el almacenamiento del semen en refrigeración tiende a reducir el metabolismo de los espermatozoides (Dessouki *et al.*, 2016). En el presente estudio, se observó una marcada reducción de la mayoría de los parámetros cinéticos a las 72 horas de refrigeración, donde solo se hallaron diferencias entre los diluyentes, para VSL y ALH (Cuadro 1), lo cual confirma que el tiempo ideal para el almacenamiento en refrigeración del semen de conejo es de 48 horas (Iaffaldano *et al.*, 2010).

No se observaron alteraciones significativas de morfología espermática en ninguno de los tratamientos durante las primeras 48 h de refrigeración (Figura 5); sin embargo, la reducción de la morfología normal, observada a las 72 h para el diluyente tris-ácido

cítrico y yema de huevo (T4), podría estar relacionada con la más temprana pérdida de la viabilidad de este tratamiento (Figura 4), la cual podría contribuir al incremento de la presencia de células degeneradas o apoptóticas.

Son pocas las publicaciones que reportan específicamente el uso de dextrosa en diluyentes para la refrigeración o la congelación de semen (Yulnawati *et al.*, 2009; Bhakat *et al.*, 2011). Así mismo, son escasos los reportes de la adición de acetato de potasio en los diluyentes, el cual se ha incluido principalmente en investigaciones con semen de cerdos y aves (Siudzińska y Łukaszewicz, 2008; Dziekońska *et al.*, 2009), no habiéndose encontrado investigaciones de ambos aditivos en semen de conejo. Sin embargo, los resultados de este estudio mostraron una menor capacidad de conservación de la calidad seminal por efecto de la refrigeración del semen con el diluyente a base de dextrosa, citrato sódico y acetato potásico (T2), con el cual se observó una rápida disminución de la movilidad y de algunos parámetros cinéticos (Cuadro 1). Así mismo, se observó cierto nivel de reducción de la vitalidad a las 48 y 72 h de refrigeración (Figura 4), aunque sin diferencia estadística con los demás tratamientos.

CONCLUSIONES

- Los diluyentes compuestos por leche descremada o caseinatos, y azúcares protegen de forma más eficiente los espermatozoides de conejo conservados mediante refrigeración.
- La presencia de caseinato de sodio en lugar de leche descremada en el diluyente produce niveles equivalentes de protección espermática durante la refrigeración, con la ventaja de aportar un diluyente de composición definida.
- El uso de un diluyente a base de dextrosa, citrato sódico y acetato potásico provee una menor capacidad de conservación de la calidad del semen de conejo sometido a refrigeración.

Agradecimientos

Al personal de la granja Román Gómez Gómez del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

LITERATURA CITADA

1. **Aksoy M, Lehimcioglu C, Akman O. 2010.** Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4 °C or freezing. *World Rabbit Sci* 66: 1115-1122. doi: 10.4995/wrs.2008.642
2. **Bhakat M, Mohanty TK, Raina VS, Gupta AK, Pankaj PK, Mahapatra RK, Sarkar M. 2011.** Study on suitable semen additives incorporation into the extender stored at refrigerated temperature. *Asian-Australas J Anim Sci* 24: 1348-1357. doi: 10.5713/ajas.2011.10243
3. **Dessouki S, Mehaisen G, Abbas A, Ashour G. 2016.** Sperm motility traits of cooled rabbit semen with different levels of melatonin. *Proc 11th World Rabbit Congress, Qingdao, China.*
4. **Di Iorio M, Manchisi A, Rocco M, Chrenek P, Iaffaldano N. 2014.** Comparison of different extenders on the preservability of rabbit semen stored at 5 °C for 72 hours. *Ital J Anim Sci* 13: 710-714. doi: 10.4081/ijas.2014.3444
5. **Dziekońska A, Fraser L, Strzezek J. 2009.** Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim Feed Sci* 18: 638-649. doi: 10.22358/jafs/66438/2009
6. **El-Seadawy I, El-Nattat W, El-Tohamy M, Aziza S, El-Senousy Y, Hussein A. 2017.** Preservability of rabbit semen after chilled storage in tris based extender enriched with different concentrations of Propolis ethanolic extract (PEE). *Asian Pac J Reprod* 6: 68-76. doi: 10.12980/apjr.6.20170204
7. **Bustamante IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra CS, Jobim MIM, Mattos RC. 2009.** Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod* 6: 392-399.
8. **Hozbor F, Ledesma A, Manes J, Ríos GL, Kaiser G, Cano A, Luciano C, et al. 2016.** Improve intra-uterine insemination in rabbits using ultra-high temperature skim milk as extender to keep semen at room temperature. *Andrologia* 48: 231-234. doi: 10.1111/and.12445
9. **Iaffaldano N, Rosato MP, Paventi G, Pizzuto R, Gambacorta M, Manchisi A, Passarella, S. 2010.** The irradiation of rabbit sperm cells with He-Ne laser prevents their *in vitro* liquid storage dependent damage. *Anim Reprod Sci* 119: 123-129. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.10.005
10. **Johinke D, de Graaf SP, Bathgate R. 2014.** Quercetin reduces the *in vitro* production of H₂O₂ during chilled storage of rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 151: 208-219. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.017
11. **Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Behan AA, Ebrahimi M. 2015.** Alpha-linolenic acid supplementation in tris extender can improve frozen-thawed bull semen quality. *Reprod Domest Anim* 50: 29-33. doi: 10.1111/rda.12445
12. **Lagares MA, Martins HS, Carvalho IA, Oliveira CA Jr, Souza MR, Penna CF, Cruz BC, et al. 2012.** Caseinate protects stallion sperm during semen cooling and freezing. *Cryo-Letters* 33: 214-219.
13. **Lavara R, Mocé E, Baselga M, Vicente JS. 2017.** Freezability genetics in rabbit semen. *Theriogenology* 102: 54-58. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.013

14. **Lopez FJ, Alvariño JR. 1998.** Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up 96 h. *World Rabbit Sci* 6: 251-253. doi: 10.4995/wrs.1998.352
15. **López-Gatiús F, Sances G, Sancho M, Yániz J, Santolaria P, Gutiérrez R, Núñez M, et al. 2005.** Effect of solid storage at 15 °C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 64: 252-260. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.11.015
16. **Martins HS, Souza MR, Penna CF, da Silva GC, Côrtes SF, Stahlberg R, Lagares MA. 2016.** Milk, caseinate and lactoferrin addition to equine semen cooling extenders. *Andrologia* 48: 862-868. doi: 10.1111/and.12523
17. **Mocé E, Lavara R, Vicente J. 2010.** Effect of cooling rate to 5 °C, straw size and farm on fertilizing ability of cryopreserved rabbit sperm. *Reprod Domest Anim* 45: e1-e7. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01507.x
18. **Mocé E, Lavara R, Vicente JS. 2002.** Effect of cooling and freezing, the two first steps of a freezing protocol, on the fertilizing ability of the rabbit sperm. *Reprod Nutr Dev* 42: 189-196. doi: 10.1051/rnd:2002017
19. **Mocé E, Vicente JS. 2009.** Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim Reprod Sci* 110: 1-24. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.08.015
20. **Nishijima K, Kitajima S, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, Matsuda Y. 2015.** Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology* 84: 1172-1175. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.018
21. **Pagl R, Aurich J, Müller-Schlösser F, Kankofer M, Aurich C. 2006.** Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology* 66: 1115-1122. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.006
22. **Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA. 2000.** Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 64: 103-112. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00185-8
23. **Rosato M, Iaffaldano N. 2011.** Effect of chilling temperature on the long-term survival of rabbit spermatozoa held either in a tris-based or a jellified extender. *Reprod Domest Anim* 46: 301-308. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01667.x
24. **Rosato M, Iaffaldano N. 2013.** Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79: 508-516. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.008
25. **Siudzińska A, Łukaszewicz E. 2008.** Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *J Appl Poult Res* 17: 101-108. doi: 10.3382/japr.2007-00048
26. **Yulnawati Y, Maheshwari H, Rizal M. 2009.** Viability and plasma membrane integrity of the spotted buffalo epididymal spermatozoa after thawing with the addition of dextrose into the extender. *Biotropia* 16: 21-27. doi: 10.11598/btb.2009.16.1.63