



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO PARA MEJORAR SU SUPERVIVENCIA A LA CRIOCONSERVACIÓN

Eva Blanch Torres

DIRECTORA: Eva Mocé Cervera

Valencia, diciembre de 2007

RESUMEN

Los espermatozoides de verraco presentan uno de los más bajos ratio colesterol/fosfolípidos de membrana. Esta característica es importante ya que el colesterol juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de la membrana espermática tras la congelación, y, por lo tanto, en la supervivencia del espermatozoide tras el proceso de criopreservación. El objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo de adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) a los espermatozoides de verraco con el fin de aumentar la cantidad de colesterol en la membrana espermática, mejorando así su supervivencia a la congelación. Para ello se trataron los espermatozoides con diferentes tipos de ciclodextrinas, a diferentes concentraciones y en diferentes fases del protocolo de congelación. Los espermatozoides tratados con metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol, a una concentración de 1 mg/120 x 10⁶ espermatozoides, añadida 15 minutos antes de comenzar la fase de enfriamiento lento hasta 16°C, presentaron mejor calidad tras la descongelación que los espermatozoides no tratados. Sin embargo, este incremento no alcanza el obtenido al tratar con CLC los espermatozoides de otras especies con bajo ratio colesterol/fosfolípidos.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 5 |
| 2.1. Medios y productos químicos | 5 |
| 2.2. Recuperación de semen y procesamiento general | 5 |
| 2.2.1. Animales | 5 |
| 2.2.2. Recuperación de semen | 5 |
| 2.2.3. Protocolo de congelación y descongelación | 6 |
| 2.2.4. Análisis de motilidad | 7 |
| 2.2.5. Análisis de viabilidad | 7 |
| 2.3. Desarrollo de un protocolo de adición de CLC a los espermatozoides de verraco previamente a la congelación (diseño experimental) | 8 |
| Experimento 1: Determinación de la fase de adición de la ciclodextrina (I) | 8 |
| Experimento 2: Determinación de la fase de adición de la ciclodextrina (II) | 9 |
| Experimento 3: Determinación del tipo de ciclodextrina más adecuado (α , β o γ - ciclodextrinas) | 12 |
| Experimento 4: Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina (I) | 13 |
| Experimento 5: Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina (II) | 14 |
| 3. RESULTADOS | 16 |
| 3.1. Determinación de la fase de adición de la ciclodextrina (I) | 16 |
| 3.1.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación | 16 |
| 3.1.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la incubación a 39°C | 17 |
| 3.2. Determinación de la fase de adición de la ciclodextrina (II) | 18 |
| 3.2.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides | 18 |

| | |
|---|-----------|
| inmediatamente tras la descongelación | |
| 3.2.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la incubación a 39°C | 19 |
| 3.3. Determinación del tipo de ciclodextrina más adecuado (α , β ó γ - ciclodextrinas) | 20 |
| 3.3.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación | 20 |
| 3.3.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación e incubación a 39°C | 20 |
| 3.4. Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina (I) | 22 |
| 3.4.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la fase de incubación a 16°C | 22 |
| 3.4.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación | 22 |
| 3.4.3. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación e incubación a 39°C | 23 |
| 3.5. Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina (II) | 24 |
| 3.5.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la fase de incubación a 16°C | 24 |
| 3.5.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación | 24 |
| 3.5.3. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación e incubación a 39°C | 25 |
| 4. DISCUSIÓN | 26 |
| 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación, cuando los espermatozoides son tratados con CLC (ciclodextrinas saturadas de colesterol) al inicio de la incubación a 16°C (clcInicio), al final de la fase de incubación (clcFinal) o no son tratados (control) | 16 |
| Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides (spz) móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación cuando los espermatozoides son diluidos hasta diferentes concentraciones de congelación: alta (10^9 spz/mL) o baja (150×10^6 spz/mL) | 16 |
| Tabla 3. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C (experimento 1) | 17 |
| Tabla 4. Porcentajes de espermatozoides (spz) móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación y la incubación en baño de agua a 39°C cuando los espermatozoides son diluidos hasta diferentes concentraciones de congelación (alta 10^9 spz/mL o baja 150×10^6 spz/mL) y las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación a 39°C | 17 |
| Tabla 5. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación, cuando los espermatozoides son tratados con CLC (ciclodextrinas saturadas de colesterol) antes de la centrifugación (clc A), después de la centrifugación (clc D) o no son tratados (control) | 18 |
| Tabla 6. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación cuando los espermatozoides sufren diferentes tipos de incubación a 16 °C (con plasma, con medio lactosa-yema de huevo (LEY) o no sufren incubación a 16°C) | 19 |
| Tabla 7. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C (experimento 2) | 19 |

- Tabla 8.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la congelación cuando los espermatozoides son tratados con diferentes tipos de ciclodextrinas saturadas de colesterol ó CLC (α -ciclodextrina (clc alfa), β -ciclodextrina (clc beta), γ -ciclodextrina (clc gamma), hydroxypropyl- α -ciclodextrina (clc hpalfa), 2HBCDcol (clc hpbeta) y 2-hydroxypropyl- γ -ciclodextrina (clc hpgamma), con ciclodextrinas no saturadas de colesterol (control negativo) o no son tratados (control) 20
- Tabla 9.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C (experimento 3) 21
- Tabla 10.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la incubación a 16°C cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 1 mg, clc 2 mg, clc 3 mg, clc 6 mg ó clc 12 mg), con diferentes concentraciones de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo 2 mg, negativo 3 mg ó negativo 6 mg) o no son tratados (control) 22
- Tabla 11.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la congelación cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 1 mg, clc 2 mg, clc 3 mg, clc 6 mg ó clc 12 mg), con diferentes concentraciones de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo 2 mg, negativo 3 mg ó negativo 6 mg) o no son tratados (control) 23
- Tabla 12.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C (experimento 4) 23
- Tabla 13.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la incubación a 16°C cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg), con 1mg de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo) o no son tratados (control) 24
- Tabla 14.** Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la congelación cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg), con 1mg de ciclodextrina no saturada de colesterol 25

(negativo) o no son tratados (control)

Tabla 15. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C (experimento 5) 25

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Esquema del protocolo de congelación utilizado para los espermatozoides de verraco | 6 |
| Figura 2. Esquema del experimento 2: incubación de las muestras a 16°C con plasma seminal | 10 |
| Figura 3. Esquema del experimento 2: incubación de las muestras a 16°C en medio LEY | 10 |
| Figura 4. Esquema del experimento 2: las muestras no sufren la incubación a 16°C | 11 |
| Figura 5. Esquema del protocolo de congelación utilizado para la adición de las ciclodextrinas en el experimento 3 | 12 |
| Figura 6: Diferentes tratamientos con CLC utilizados en: espermatozoides incubados a 16°C con plasma seminal, en espermatozoides incubados a 16°C con medio lactosa-yema de huevo (medio LEY) o en espermatozoides que no son sometidos a la incubación a 16°C. | 29 |

1. INTRODUCCIÓN

La explotación del ganado porcino es una de las producciones más importantes (detrás de la producción avícola) en España, siendo ésta uno de los principales productores de Europa, tanto por el número de animales como por la tecnología desarrollada y utilizada (García Casado, 2007).

El uso de la inseminación artificial presenta muchas ventajas, tales como: una amplia difusión del material genético del verraco seleccionado, mejoras sanitarias en la explotación al evitar el contacto macho-hembra, la evaluación continua del potencial reproductivo de los machos, el mejor control de los resultados reproductivos de una explotación y la reducción del número de verracos. La aplicación de la inseminación artificial en la industria porcina en muchos de los países europeos, incluida España, es muy elevada, superando el 80 % de las reproductoras (Gadea, 2006).

En la práctica totalidad de las inseminaciones artificiales que se realizan en porcino se utiliza semen refrigerado a 15-20°C (Johnson et al, 2000), ya que la fertilidad del semen congelado tradicionalmente ha sido sensiblemente menor que la obtenida con semen refrigerado, estimándose una reducción media del 20% en la tasa de partos (Gadea, 2006). Sin embargo, en los últimos años varios autores han obtenido resultados de fertilidad elevados tras el uso de semen congelado en inseminación cervical (Eriksson et al., 2002; Sellés et al., 2003) o tras la inseminación intrauterina profunda (Roca et al., 2003).

Desde que en los años '50 se consiguiera utilizar con éxito el glicerol como agente crioprotector en espermatozoides (Polge et al, 1949) se han desarrollado espectacularmente los sistemas de congelación de todo tipo de células y, sin embargo, sólo se ha implantado el uso de semen congelado en la especie humana y en la especie bovina, siendo la base para las grandes mejoras productivas obtenidas en las razas bovinas lecheras (Zeng y Terada, 2001b). La congelación de los espermatozoides de porcino no resultó tan exitosa y es en el año 1975 cuando se desarrollan dos métodos de congelación que pueden ser aplicados a nivel comercial (Pursel y Johnson, 1975; Westendorf et al, 1975) basados en la utilización de yema de huevo, glicerol, azúcares y un agente detergente (Orvus Es Paste). Estos protocolos, sobre todo el desarrollado por Westendorf, son los que se utilizan actualmente, con algunas modificaciones con respecto al envasado, a las curvas de enfriamiento, a la fase de adición del crioprotector, etc.

En la última década se han realizado numerosos estudios con el objetivo de mejorar la fertilidad de los espermatozoides congelados siguiendo diferentes estrategias:

- optimización de los sistemas de congelación y descongelación (nuevos diluyentes, nuevos envases, aditivos, curvas de congelación automatizadas...).
- adecuación de las condiciones de la inseminación artificial (protocolos de sincronización de celo, diagnósticos de ovulación por ecografía, inseminaciones intrauterinas profundas...).
- selección de reproductores por su capacidad de congelación y no sólo por sus rendimientos reproductivos.

De esta manera es posible mejorar los rendimientos reproductivos de los espermatozoides congelados, permitiendo su uso fundamentalmente para la incorporación de genética de alto valor a la explotación, ya que permite el intercambio de material genético a larga distancia y durante un periodo de tiempo ilimitado. Otras posibles aplicaciones del semen congelado son la creación de bancos genéticos para la conservación de razas en peligro de extinción o para asegurar la continuidad de líneas genéticas valiosas ante posibles situaciones desfavorables (por ejemplo epizootías) o el uso en experimentación (Gadea, 2006). También es de gran utilidad para la conservación de espermatozoides sometidos a algún proceso tecnológico que aumente su valor, como por ejemplo los espermatozoides sexados o los espermatozoides vectores de ADN exógeno.

El proceso de congelación de los espermatozoides consta de varios pasos (descenso de temperatura hasta 5°C, adición del crioprotector y envasado en pajuelas, congelación, almacenamiento y descongelación e inseminación o dilución) que producen en la célula espermática cambios de volumen y cambios de temperatura que alteran las propiedades físico-químicas de su membrana plasmática (Hammerstedt et al., 1990). Los daños que sufren las células espermáticas cuando son sometidas al proceso de congelación son debidos a:

- estrés osmótico: adición/eliminación del crioprotector y congelación del agua extracelular.
- estrés mecánico: formación de hielo intra/extracelular.
- estrés térmico: descenso de temperatura hasta 5°C.

A continuación, se exponen detalladamente los daños inducidos en los espermatozoides durante el proceso de crioconservación:

Estrés osmótico: Durante el proceso de congelación las células sufren cambios de volumen durante la adición y eliminación de los crioprotectores permeables, así como durante la congelación y descongelación del agua extracelular. Los crioprotectores permeables son capaces de atravesar la membrana plasmática, pero su paso es más lento que el del agua, debido a su peso molecular. Esta respuesta osmótica puede ser potencialmente letal si la célula alcanza sus límites de tolerancia osmótica. Durante la adición del crioprotector las células disminuyen de tamaño transitoriamente al perder el agua intracelular debido al ambiente hiperosmótico que se crea. Poco a poco, las células recuperan su tamaño original al equilibrarse las condiciones osmóticas dentro y fuera de la célula. Este proceso se revierte cuando el crioprotector es diluido (cuando se realiza la inseminación artificial). Además, las células son sometidas a condiciones de estrés osmótico durante la congelación y descongelación del agua extracelular, tal y como se explica posteriormente. En comparación con los espermatozoides de otros mamíferos, los espermatozoides de verraco son muy sensibles a los cambios osmóticos. Sólo toleran cambios de volumen de 1,02 a 0,97 veces su volumen inicial, manteniendo un 70% de su motilidad (Gilmore et al., 1998).

Estrés mecánico: Cuando los espermatozoides son enfriados por debajo del punto de congelación de la solución en la que se encuentran comienzan a formarse cristales de hielo en el medio extracelular. Debido al diferencial de la

presión osmótica, el agua intracelular comienza a salir de la célula y a congelarse. Este fenómeno está influenciado por la permeabilidad de la membrana plasmática, la concentración de crioprotector y, sobre todo, por la velocidad de congelación y descongelación (que deben estar en concordancia) (Hammerstedt et al., 1990):

- Con una velocidad de congelación demasiado lenta el espermatozoide pierde toda el agua intracelular, de manera que no se forman cristales de hielo intracelulares. Sin embargo, los espermatozoides son sometidos a condiciones hiperosmóticas durante mucho tiempo, por lo que se dañan.
- Con una velocidad de congelación demasiado rápida el agua intracelular no llega a salir del espermatozoide y se forma hielo intracelular (Johnson et al., 2000).

Estrés térmico: Durante el enfriamiento hasta 5°C la membrana plasmática sufre una reorganización de sus componentes (Hammerstedt et al., 1990). La membrana consta de un bicapa lipídica compuesta por diferentes tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol. Cada una de las especies de fosfolípidos presenta una temperatura de transición de fase diferente. Cuando la membrana es sometida a un descenso de temperatura, se produce un cambio de fase de los fosfolípidos de fase líquida-cristalina a fase de gel y las cadenas de ácidos grasos que los componen se convierten en rígidas y paralelas. Se forman dominios de gel a medida que las diferentes familias de fosfolípidos llegan a su temperatura de transición de fase (mientras los fosfolípidos de otras familias siguen en fase líquida), de manera que se rompen las asociaciones normales de los fosfolípidos (entre ellos y con las proteínas de membrana) y el resultado final es una agrupación de lípidos por familias, una redistribución de las proteínas, y una mayor rigidez de membrana (Amann, 1999). Cuando la membrana es devuelta a la temperatura inicial, los fosfolípidos vuelven al estado líquido, pero ni éstos ni las proteínas vuelven a su localización inicial, produciendo una alteración en la función de la membrana plasmática. Así, se observa un incremento de la permeabilidad a cationes y agua, interferencias en los procesos de difusión en los que se encuentran implicadas las proteínas integrales, actividad reducida de los enzimas asociadas a la membrana, etc.

La cantidad de colesterol presente en la membrana influye en el comportamiento termotrópico de la misma y sus componentes (Johnson et al., 2000), ya que el colesterol interactúa con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Watson, 1981) inhibiendo la cristalización de los hidrocarburos a bajas temperaturas. Con altos niveles de colesterol en membrana se reduce o incluso se elimina la transición de fase de los fosfolípidos (Purdy y Graham, 2004). Giraud et al. (2000) observaron en espermatozoides de humano que la fluidez de membrana antes de la crioconservación está relacionada con la supervivencia a la congelación. El colesterol modula la fluidez de membrana: por encima de las temperaturas de transición de los lípidos que componen la membrana, el colesterol disminuye la fluidez de membrana, mientras que cuando la temperatura desciende por debajo de las temperaturas de transición el colesterol ejerce el efecto contrario (Purdy et al., 2005). Flesch et al. (2001) detectaron dos subpoblaciones de espermatozoides en los eyaculados de

verracos que diferían en la cantidad de colesterol presente en sus membranas y, por lo tanto, en su fluidez de membrana. Purdy et al. (2005) observaron también estas dos subpoblaciones en los eyaculados de toros y observaron que la población con alta fluidez de membrana a temperatura ambiente (baja cantidad de colesterol) era más sensible a la congelación y que la adición de colesterol a estos espermatozoides resultaba en un aumento en la supervivencia a la congelación.

El ratio colesterol/fosfolípidos es un importante factor determinante de la fluidez de membrana. Darin-Bennet y White (1979) observaron que existían diferencias en el ratio colesterol/fosfolípidos entre especies y que las especies con bajo ratio (menor de 0,6 como en cerdos, caballos, moruecos, toros o cabras; Parks et al., 1992) eran más susceptibles a la congelación que las especies con alto ratio (cercano a 1, como los conejos o el hombre). La adición de colesterol a la membrana de los espermatozoides que poseen bajo ratio colesterol/fosfolípidos aumenta su supervivencia al enfriamiento y a la congelación (Purdy et al., 2005).

El contenido en colesterol de las membranas puede ser modificado fácilmente mediante el uso de ciclodextrinas (Christian et al., 1997). Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por 1-4 unidades de β -glucopiranososa con una cara hidrofílica que les permite ser solubles en agua y una cara hidrofóbica que les aporta la capacidad de encapsular compuestos hidrófobos, tales como el colesterol. Así, las ciclodextrinas son capaces de transferir el colesterol (si han sido presaturadas con colesterol) o de extraer el colesterol (en caso de que no hayan sido presaturadas) de las membranas de muchos tipos de células, incluidos los espermatozoides. Esta transferencia se cree que se produce mediante gradiente de concentración (Moore et al., 2005).

Varios autores han demostrado que la incubación de los espermatozoides de algunas de las especies que presentan bajo ratio colesterol/fosfolípidos con ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) antes de la congelación, mejora la supervivencia de los espermatozoides a la crioconservación. Esta mejora se ha observado en caballos (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005, Zahn et al., 2002), en burros (Alvarez et al., 2006), en toros (Purdy y Graham, 2004; Mocé y Graham, 2005), en moruecos (Morrier et al., 2004; Mocé et al., 2006, datos no publicados) y en caprino (Barrera-Compean et al., 2005).

Se han realizado pocos estudios sobre el uso de CLC en espermatozoides de verracos y sus resultados son contradictorios. Zeng y Terada (2000; 2001a; 2001b) observaron que el tratamiento de los espermatozoides de porcino con ciclodextrina no saturada de colesterol mejoraba la supervivencia a la congelación, mientras que la adición de colesterol al medio la empeoraba. Por otro lado, Galantino-Homer et al. (2006) observaron un incremento en la viabilidad de los espermatozoides después de ser sometidos a cold-shock cuando fueron previamente tratados con ciclodextrinas y colesterol.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo de adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol adecuado para la especie porcina, con el fin de aumentar la cantidad de colesterol en la membrana de los espermatozoides, incrementando así su supervivencia a la congelación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MEDIOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado reactivo procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, España) excepto el SYBR-14 y el yoduro de propidio (PI) que procedían de Invitrogen (Barcelona, España).

La solución de dilución utilizada en todos los experimentos fue Beltsville Thawing Solution (BTS: 37 g/L glucosa, 1,25 g/L EDTA, 6 g/L citrato sódico, 1,25 g/L bicarbonato sódico, 0,75 g/L cloruro potásico, 300 mOsm, pH = 7,2; Johnson et al., 2000). Como solución de descongelación se utilizó BTS suplementado con albúmina sérica bovina (BSA; 6 mg/mL).

Para la congelación se utilizó el diluyente Lactosa-yema de huevo (LEY: 80 mL lactosa al 11%, 20 mL yema de huevo, 300 mOsm, pH = 7; Westendorf et al., 1975). El diluyente fue centrifugado a 12.000 g durante 20 minutos a 5°C, se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de membranas de filtro de 5 µm, 3 µm y 1,2 µm de diámetro de poro. Como diluyente glicerolado se suplementó el medio LEY con 1,5% Orvus es Paste y 9% glicerol (LEYGO; Westendorf et al., 1975).

Las ciclodextrinas fueron saturadas de colesterol (CLC) mediante la técnica descrita por Purdy y Graham (2004). Brevemente, se disolvieron 200 mg de colesterol en 1 mL de cloroformo (solución A) y 1 g de ciclodextrina con 2 mL metanol (solución B). A continuación se añadieron 0,45 mL de la solución A en la solución B hasta obtener una dilución transparente, dejándola secar en placas de Petri de vidrio. Después del secado se recuperó el sedimento y fue almacenado en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso. La concentración de la solución de trabajo de CLC y de ciclodextrina sin saturar de colesterol (CD) fue de 50 mg de CLC o CD/mL BTS y el tiempo de incubación de los espermatozoides con las CLC o CD fue de 15 minutos.

2.2. RECUPERACIÓN DE SEMEN Y PROCESAMIENTO GENERAL

2.2.1. ANIMALES

En cada experimento se utilizaron de 9-15 eyaculados procedentes de 5-9 verracos adultos de la raza Pietrain con un ritmo de recogida semanal, alimentados con una dieta comercial una vez al día y con acceso libre al agua de bebida.

2.2.2. RECUPERACIÓN DE SEMEN

La recolección del semen se llevó a cabo mediante la técnica de masaje manual, recogiendo el eyaculado completo directamente sobre un recipiente atemperado a 37°C provisto de un filtro y diluyéndolo (1:1, vol/vol) con solución

BTS a 37°C. El semen fue transportado a 22°C durante 3 horas y a su llegada al laboratorio se analizó la motilidad de forma subjetiva diluyendo una alícuota en BTS-BSA a 22°C hasta 20×10^6 espermatozoides/mL. La motilidad se evaluó colocando una gota de 10 μ L de semen entre porta y cubre atemperado a 37°C, bajo un microscopio con contraste de fases negativo, a 400 aumentos y con platina térmica atemperada a 37°C. Además, se determinó el volumen y la concentración.

Para determinar la concentración se realizó una dilución 1:200 (v/v) con una solución de glutaraldehído al 0,25% en Phosphate Buffered Saline (PBS) y se realizó un recuento en cámara de recuento celular Neubauer modificada bajo un microscopio de campo claro a 400 aumentos. Posteriormente el semen fue dividido en diferentes alícuotas, según el tipo de experimento, como se detalla a continuación.

2.2.3. PROTOCOLO DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

El protocolo general de congelación utilizado fue el descrito por Gadea et al., (2005). El semen fue enfriado lentamente hasta 16°C durante 2 horas y, posteriormente, centrifugado a 800 g durante 10 minutos a 16°C. Se eliminó el plasma seminal y el pellet fue resuspendido con diluyente LEY atemperado a 16°C hasta una concentración de 225×10^6 espermatozoides/mL. Después de una segunda fase de enfriamiento lento hasta 5°C durante 2 horas, los espermatozoides fueron diluidos con medio LEYGO atemperado a 5°C (2:1; vol/vol) hasta llegar a una concentración final de 150×10^6 espermatozoides/mL y 3% glicerol, con una fase de equilibrado de 15 minutos antes de ser envasado en pajuelas de 0,5 mL. Tras sellar las pajuelas éstas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido, suspendiendo las pajuelas a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 20 minutos, siendo posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó en baño de agua a 39°C durante 30 segundos.

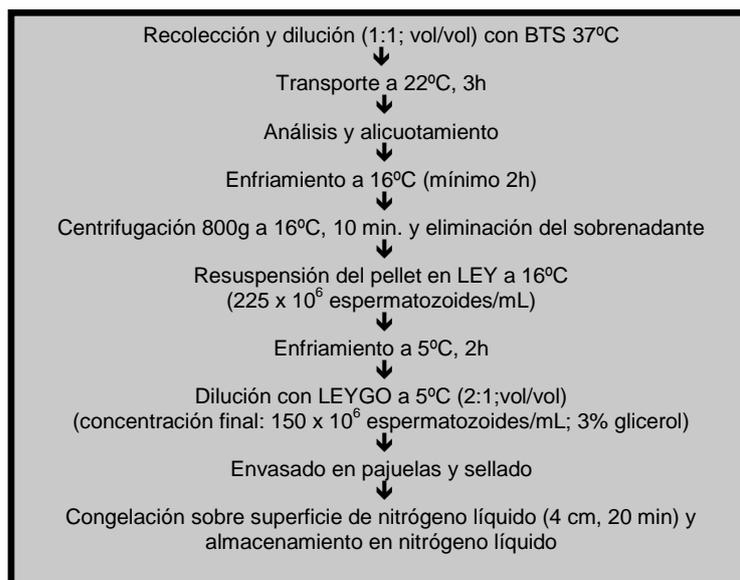


Figura 1- Esquema del protocolo de congelación utilizado para los espermatozoides de verraco

2.2.4. ANÁLISIS DE MOTILIDAD

Se evaluó la motilidad de los espermatozoides tras la incubación a 16°C y tras la descongelación (dependiendo del experimento). Para ello se descongeló una pajuela por tratamiento, las muestras fueron diluidas con BTS-BSA hasta una concentración de 20-30x10⁶ espermatozoides/mL y equilibradas a 39°C durante 10 minutos. Las muestras diluidas fueron sometidas a una incubación en baño de agua a 39°C siendo evaluadas a las 0,1 y 3 horas (dependiendo del experimento). Para el análisis de la motilidad se analizaron 5 µL de cada muestra en una cámara Makler atemperada a 39°C. Se examinaron 3 campos y un mínimo de 200 espermatozoides por muestra. Cada trayectoria identificada fue analizada visualmente para eliminar los posibles errores.

Se analizó el porcentaje de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos mediante un sistema computerizado de análisis de la movilidad (ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España). Para el análisis de la motilidad las imágenes se capturaron con un objetivo 10x en contraste de fases negativo mediante un microscopio Nikon Eclipse 90i (Tokio, Japón) y una video cámara monocroma Basler (Alemania). Los parámetros de configuración utilizados fueron los siguientes: se tomaron 25 imágenes en 1 segundo, el área de partícula admitida fue de 20 a 80 micras, se tomaron como espermatozoides rápidos aquellos con una velocidad superior a 45 micras/seg, como espermatozoides medios aquellos con una velocidad entre 45-25 micras/seg y como espermatozoides lentos aquellos con una velocidad entre 25-10 micras/seg y se consideraron espermatozoides con movimiento progresivo aquellos con un índice de rectitud (STR) mayor de 45%.

2.2.5. ANÁLISIS DE VIABILIDAD

La viabilidad espermática se valoró mediante la evaluación de la integridad de membrana plasmática del espermatozoide utilizando citometría de flujo según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004). Para ello se descongeló una pajuela por tratamiento, y las muestras fueron primero diluidas hasta 30x10⁶ espermatozoides/mL con BTS-BSA. A continuación se tomó una alícuota de 100 µL de semen, se diluyó con 450 µL de BTS-BSA (concentración final 5,5 x 10⁶ espermatozoides/mL) y se tiñó con 2,5µL de SYBR-14 (solución madre de 10 µM en DMSO) y 2,5µL de yoduro de propidio (PI; solución stock 1mg/mL en agua ultrapura). Las muestras fueron incubadas durante al menos 5 minutos a 22°C antes de ser analizadas. Se utilizó un Citómetro Coulter EPICS XL-MCL (IZASA, Barcelona, España) equipado con un láser de argón a 488 nm. Se recogieron datos de fluorescencia de 10.000 eventos. La fluorescencia del SYBR-14 fue recogida en el sensor FL1 usando un filtro de paso de banda de 525 nm y la fluorescencia del PI se recogió en el sensor FL3 con un filtro de paso de banda de 620 nm. Las observaciones se realizaron a 0,1 y 3 horas tras incubación de las muestras en baño de agua a 39°C (según experimento). Mediante este protocolo sólo las células se tiñen de verde con SYBR-14 (permitiendo desechar las partículas de yema de huevo) y el PI tiñe de rojo los espermatozoides con la membrana dañada (siendo ésta la población que se considera como muerta).

2.3. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ADICIÓN DE CLC A LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO PREVIAMENTE A LA CONGELACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)

Se realizaron cinco experimentos para determinar el tipo de ciclodextrina, la concentración de ciclodextrina y la fase de adición de la ciclodextrina más adecuados. Paralelamente también se compararon:

- diferentes concentraciones de congelación del semen (la concentración normalmente utilizada (10^9 espermatozoides/mL) frente a 150×10^6 espermatozoides/mL) con el objetivo de poder realizar un mayor número de tratamientos por eyaculado.
- diferentes tipos de incubación a 16°C con el fin de agilizar el protocolo de congelación, ya que era posible que la adición de CLC permitiera una velocidad más alta de enfriamiento del semen.

Experimento 1: Determinación de la fase de adición de la ciclodextrina (I)

En este experimento se utilizaron 10 eyaculados procedentes de 5 verracos con el objetivo de evaluar dos concentraciones de congelación (10^9 vs 150×10^6 espermatozoides/mL) y dos fases diferentes de adición de las ciclodextrinas a lo largo del protocolo de crioconservación (al inicio y al final de la fase de incubación a 16°C). Para ello se alicuotó el semen en 3 tipos de muestras con 800×10^6 espermatozoides cada una: una muestra no tratada que se utilizó como control (C), una muestra tratada con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina saturada de colesterol (2HBCDcol) 15 minutos antes de iniciar la fase de incubación a 16°C (clc Inicio) y una tercera muestra tratada con 2HBCDcol 15 minutos antes de finalizar la fase de incubación a 16°C (clc Final). Las muestras clc Inicio y clc Final fueron tratadas con 2 mg de 2HBCDcol/ 120×10^6 espermatozoides, eligiendo esta ciclodextrina porque en algunas especies se ha observado que ofrece mejores resultados que otros tipos de ciclodextrina y esta concentración por ser una de las más utilizadas en los protocolos de adición de CLC en otras especies. Cada uno de los tipos de muestra (C, clc Inicio, clc Final) fueron congelados siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Figura 1), pero utilizando dos concentraciones de congelación diferentes: 10^9 espermatozoides/mL (alta) y 150×10^6 espermatozoides/mL (baja).

Se evaluó la motilidad de los espermatozoides descongelados a las 0, 1 y 3 horas de la incubación en baño de agua a 39°C y la viabilidad de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación, según los protocolos descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis, las variables móviles totales y móviles progresivos fueron transformadas siguiendo la transformación de Freeman y Tukey, aunque los datos se muestran en las tablas en la escala original.

Se realizaron dos tipos de análisis:

- 1- Se utilizaron los datos a las 0 horas (muestras descongeladas) para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC y de las diferentes concentraciones de congelación sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente después de la congelación. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, clc Inicio y clc Final), concentración (alta y baja), su interacción y el efecto aleatorio de eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).
- 2- Se utilizaron los datos a las 0, 1 y 3 horas de la incubación a 39°C para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC y de las diferentes concentraciones de congelación sobre la supervivencia de los espermatozoides a lo largo de las tres horas de incubación a 39°C. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, clc Inicio y clc Final), concentración (alta y baja), horas (0, 1 y 3h), sus interacciones dobles y el efecto aleatorio de eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).

Experimento 2: Determinación de la fase de adición de la ciclodextrina (II)

El objetivo de este experimento fue perfilar la fase del protocolo de congelación más adecuada para añadir las CLC (antes o después de la centrifugación). Además se compararon diferentes tipos de incubación a 16°C (incubación con plasma seminal, con medio LEY o sin fase de incubación a 16°C). En este experimento se utilizaron 9 eyaculados procedentes de 6 verracos. Cada eyaculado fue dividido en tres muestras de 800×10^6 espermatozoides cada una: una muestra no tratada se utilizó como control (C), otra muestra fue tratada con 2HBCDcol antes de la centrifugación (clcA) y la otra muestra fue tratada con 2HBCDcol después de la centrifugación (clcD). Las muestras clcA y clcD fueron tratadas con 2mg 2HBCDcol/ 120×10^6 espermatozoides. Cada uno de los tipos de muestra fue sometido a tres modelos de incubación a 16°C:

- a) Incubación a 16°C con plasma seminal. Se incubó la muestra clcA durante 15 minutos con CLC y después las tres muestras (C, clcA y clcD) se incubaron con el plasma seminal durante la fase de descenso de temperatura a 16°C. Posteriormente se centrifugaron, se eliminó el plasma seminal, la muestra clcD se trató con CLC y las muestras fueron resuspendidas en medio LEY (Figura 2). En este caso, el protocolo de congelación es el que se utiliza habitualmente para el ganado porcino (descenso de temperatura a 16°C en presencia de plasma seminal). El resto de la congelación se realizó como se ha descrito previamente (Figura 1).

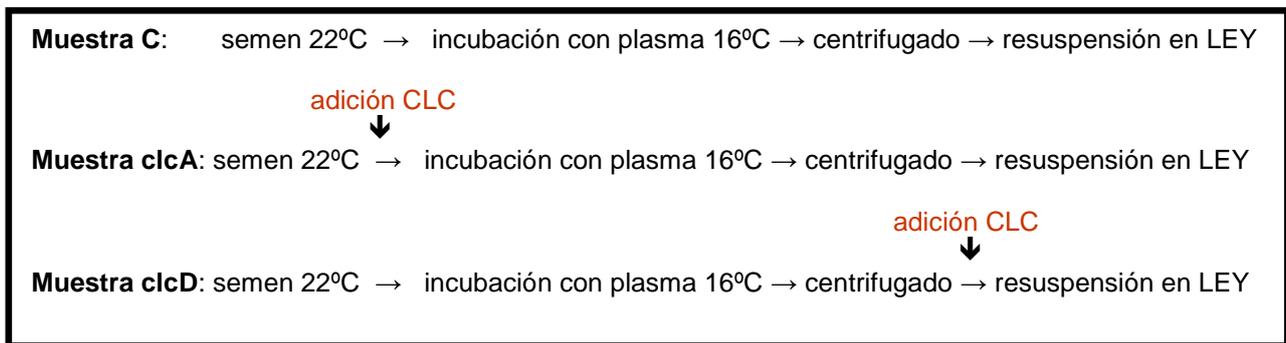


Figura 2. Esquema del experimento 2: incubación de las muestras a 16°C con plasma seminal

- b) Incubación a 16°C con medio LEY. Se incubó la muestra clcA durante 15 minutos con CLC, después las tres muestras se centrifugaron, se eliminó el plasma seminal y la muestra clcD se trató con CLC. A continuación las muestras fueron resuspendidas en medio LEY y los espermatozoides fueron incubados a 16°C durante 2 horas (la fase de descenso de temperatura a 16°C se realizó en medio LEY) (Figura 3). Al centrifugar antes de la incubación se conseguía que el descenso de la temperatura a 16°C se produjese junto a las CLC y que la adición de las CLC ocurriera después de la centrifugación y sin presencia de yema de huevo. El resto de la congelación se realizó de la forma habitual (Figura 1).

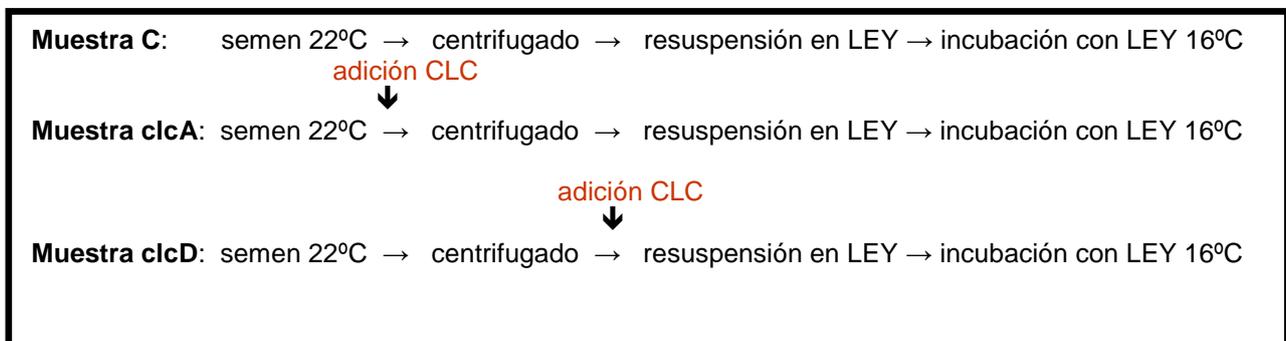


Figura 3. Esquema del experimento 2: incubación de las muestras a 16°C en medio LEY

- c) Sin incubación a 16°C. Se incubó la muestra clcA durante 15 minutos con CLC y después las tres muestras fueron centrifugadas y liberadas del plasma seminal, la muestra clcD fue tratada con CLC, las muestras fueron resuspendidas en medio LEY y a continuación se realizó el descenso lento de temperatura a 5°C, sin que los espermatozoides fuesen sometidos a la fase de descenso lento de temperatura a 16°C (Figura 4). El resto de la congelación se realizó de la forma habitual (Figura 1). Con este experimento se pretendía estudiar si es posible acortar el protocolo de congelación del ganado porcino haciéndolo similar al de otras especies ganaderas.

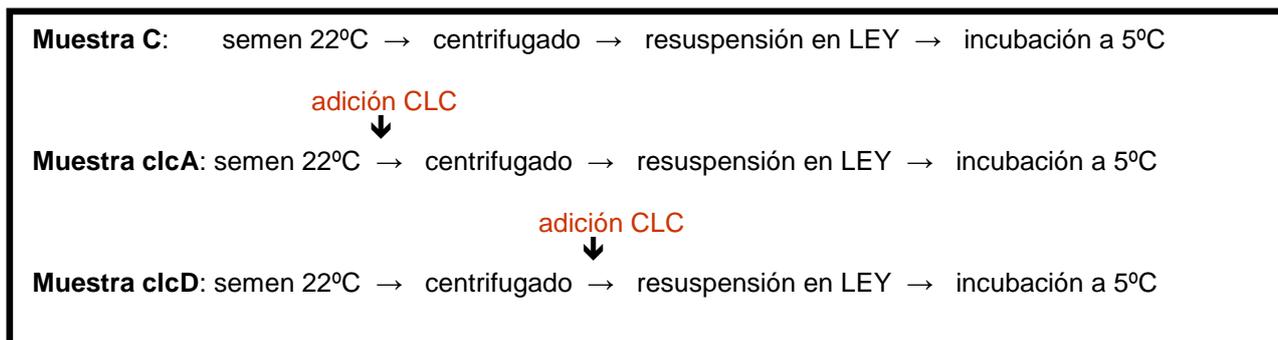


Figura 4. Esquema del experimento 2: las muestras no sufren la incubación a 16°C

Se evaluó la motilidad de los espermatozoides descongelados a las 0, 1 y 3 horas de la incubación en baño de agua a 39°C y la viabilidad de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación, según los protocolos descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Se realizaron dos tipos de análisis:

- 1- Se utilizaron los datos a las 0 horas (muestras descongeladas) para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC y de los diferentes tipos de incubación a 16°C sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente después de la congelación. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, clcA y clcD), incubación (plasma, con medio LEY o sin incubación), su interacción y el efecto aleatorio de eyaculado (1-9) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).
- 2- Se utilizaron los datos a las 0, 1 y 3 horas de la incubación a 39°C para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC y de los diferentes tipos de incubación a 16°C sobre la supervivencia de los espermatozoides a lo largo de las tres horas de incubación a 39°C. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, clcA y clcD), incubación (plasma, con medio LEY o sin incubación), horas (0, 1 y 3h), sus interacciones dobles y el efecto aleatorio de eyaculado (1-9) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002). Para realizar los análisis las variables móviles totales y móviles progresivos fueron transformadas siguiendo la transformación de Freeman y Tukey, aunque los datos se muestran en las tablas en la escala original.

Experimento 3: Determinación del tipo de ciclodextrina más adecuado (α , β o γ - ciclodextrinas)

En este experimento se utilizaron 10 eyaculados procedentes de 6 verracos con el fin de determinar el tipo de ciclodextrina más adecuado (α , β o γ -ciclodextrina). Para ello cada eyaculado fue dividido en 8 alícuotas de 800×10^6 espermatozoides cada una: una de las alícuotas no fue tratada utilizándola como control (C) y otra fue tratada con metil- β -ciclodextrina (MBCD) no saturada de colesterol y se utilizó como control negativo (N), esta ciclodextrina fue elegida por su facilidad de preparación. Las demás alícuotas fueron tratadas con α -ciclodextrina (clc alfa), β -ciclodextrina (clc beta), γ -ciclodextrina (clc gamma), hidroxipropil- α -ciclodextrina (clc hpalfa), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (clc hpbeta) y 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina (clc hpgamma) todas ellas saturadas de colesterol. Las muestras fueron tratadas con 2mg de CLC o CD/ 120×10^6 espermatozoides durante 15 minutos a 22°C antes del inicio de la fase de incubación con plasma seminal a 16°C , siguiendo el protocolo descrito en la Figura 5 y posteriormente las muestras fueron congeladas siguiendo el protocolo habitual (Figura 1).

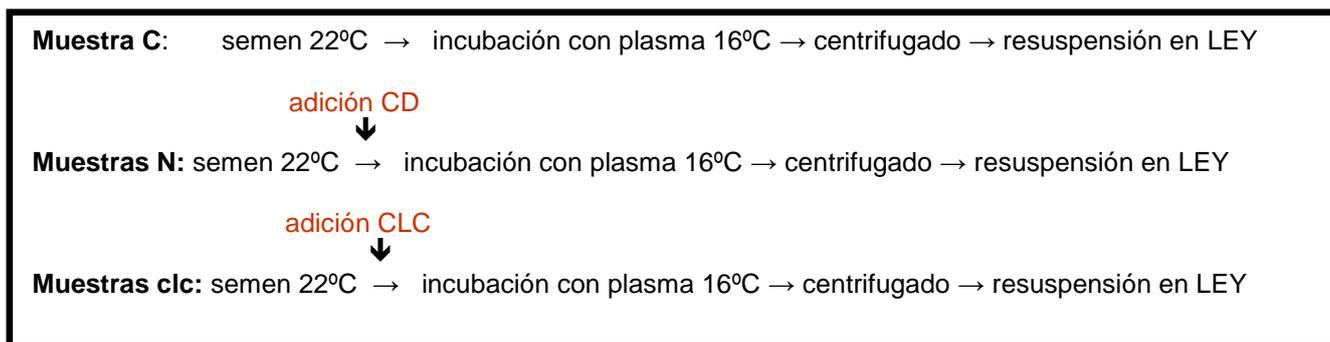


Figura 5. Esquema del protocolo de congelación utilizado para la adición de las ciclodextrinas

Se evaluó la motilidad y viabilidad de los espermatozoides descongelados a las 0, 1 y 3 horas de la incubación en baño de agua a 39°C , según los protocolos descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos fueron transformadas siguiendo la transformación de Freeman y Tukey, aunque los datos se muestran en las tablas en la escala original. Se realizaron dos tipos de análisis:

- 1- Se utilizaron los datos a las 0 horas (muestras descongeladas) para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente después de la congelación. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con el efecto fijo de CLC (control, negativo, clc alfa, clc beta, clc gamma, clc hpalfa, clc hpbeta y clc hpgamma) y el efecto aleatorio de

eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).

- 2- Se utilizaron los datos a las 0, 1 y 3 horas de la incubación a 39°C para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC sobre la supervivencia de los espermatozoides a lo largo de las tres horas de incubación a 39°C. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, negativo, clc alfa, clc beta, clc gamma, clc hpalfa, clc hpbeta y clc hpgamma), horas (0, 1 y 3h), su interacción doble y el efecto aleatorio de eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).

Experimento 4: Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina (I)

El experimento constó de 10 repeticiones para las que se utilizaron 5 verracos con el objetivo de delimitar el rango de concentraciones óptimo de ciclodextrina. Se utilizaron 9 alícuotas de cada eyaculado, una de ellas no fue tratada y se utilizó como control (C), tres de ellas se utilizaron como controles negativos siendo tratadas con MBCD a 2 mg (negativo 2mg), 3 mg (negativo 3mg) ó 6 mg (negativo 6mg) de ciclodextrina/ 120×10^6 espermatozoides y las 5 restantes fueron tratadas con metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol (MBCDcol) a las concentraciones de 1 mg (clc1mg), 2 mg (clc2mg), 3 mg (clc3mg), 6 mg (clc6mg) ó 12 mg (clc12mg) de MBCDcol/ 120×10^6 espermatozoides. Se eligió la MBCDcol debido a que es una de las ciclodextrinas más utilizadas en otras especies, también debido a que es una de las más económicas y a su facilidad de preparación, ya que en el experimento 3 no se observaron diferencias entre los tipos de ciclodextrinas analizados. Las muestras fueron tratadas con las CLC o CD durante 15 minutos a 22°C antes del inicio de la fase de incubación con plasma seminal a 16°C siguiendo el protocolo descrito en la Figura 5 y posteriormente las muestras fueron congeladas siguiendo el protocolo habitual (Figura 1).

Se evaluó la motilidad de los espermatozoides tras la incubación a 16°C, y de las muestras descongeladas tras 0, 1 y 3 horas de la incubación en baño de agua a 39°C. La viabilidad de las muestras descongeladas fue evaluada tras 0 y 1 horas de incubación en baño de agua a 39°C, según los protocolos descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos fueron transformadas siguiendo la transformación de Freeman y Tukey, aunque los datos se muestran en las tablas en la escala original. Se realizaron dos tipos de análisis:

- 1- Las observaciones tras la incubación a 16°C se utilizaron para descartar las muestras que presentaran bajos porcentajes de motilidad debido a una posible toxicidad como consecuencia del tratamiento con altas

concentraciones de CD o CLC. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con el efecto fijo de CLC (control, negativo 2mg, negativo 3mg, negativo 6 mg, clc 1 mg, clc 2mg, clc 3 mg, clc 6 mg y clc 12 mg) y el efecto aleatorio de eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002). En este caso no fue necesario transformar la variable móviles totales.

- 2- Se utilizaron los datos a las 0 horas (muestras descongeladas) para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente después de la congelación. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con el efecto fijo de CLC (control, negativo 2mg, negativo 3mg, negativo 6 mg, clc 1 mg, clc 2mg, clc 3 mg, clc 6 mg y clc 12 mg) y el efecto aleatorio de eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).
- 3- Se utilizaron los datos a las 0, 1 y 3 horas de la incubación a 39°C para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC sobre la supervivencia de los espermatozoides a lo largo de las tres horas de incubación a 39°C. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, negativo 2mg, negativo 3mg, negativo 6 mg, clc 1 mg, clc 2mg, clc 3 mg, clc 6 mg y clc 12 mg), horas (0, 1 y 3h), su interacción doble y el efecto aleatorio de eyaculado (1-10) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).

Experimento 5: Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina (II)

Siguiendo con el objetivo del ensayo anterior, el fin de este experimento fue precisar la concentración óptima de CLC dentro del rango de concentraciones obtenido en el experimento anterior. Se utilizaron 15 eyaculados procedentes de 9 verracos y cada uno de ellos fue dividido en 6 alícuotas: una de ellas no sufrió ningún tratamiento siendo la muestra control (C), otra alícuota fue tratada con MBCD a 2 mg/120x10⁶ espermatozoides (según los resultados del experimento 4) siendo la muestra control negativo (negativo 2mg) y 4 alícuotas se trataron con 0,5 mg (clc0,5mg), 1 mg (clc1mg), 1,5 mg (clc1,5) ó 2 mg (clc2mg) de MBCDcol/120x10⁶ espermatozoides. Las muestras fueron tratadas con las CLC o CD durante 15 minutos a 22°C antes del inicio de la fase de incubación con plasma seminal a 16°C siguiendo el protocolo descrito en la Figura 5 y posteriormente las muestras fueron congeladas siguiendo el protocolo habitual (Figura 1).

Se evaluó la motilidad de los espermatozoides tras la incubación a 16°C, y de las muestras descongeladas tras 0 y 1 horas de la incubación en baño de agua a 39°C. La viabilidad de las muestras descongeladas fue evaluada tras 0 y 1 horas de incubación en baño de agua a 39°C, según los protocolos descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos fueron transformadas siguiendo la transformación de Freeman y Tukey , aunque los datos se muestran en las tablas en la escala original. Se realizaron dos tipos de análisis:

- 1- Las observaciones tras la incubación a 16°C se utilizaron para descartar las muestras que presentaran bajos porcentajes de motilidad debido a una posible toxicidad como consecuencia del tratamiento con altas concentraciones de CLC. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con el efecto fijo de CLC (control, negativo, clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg) y el efecto aleatorio de eyaculado (1-15) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002). En este caso no fue necesario transformar la variable móviles totales.
- 2- Se utilizaron los datos a las 0 horas (muestras descongeladas) para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente después de la congelación. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con el efecto fijo de CLC (control, negativo, clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg) y el efecto aleatorio de eyaculado (1-15) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002).
- 3- Se utilizaron los datos a las 0, 1 y 3 horas de la incubación a 39°C para analizar los efectos de los diferentes tratamientos con CLC sobre la supervivencia de los espermatozoides a lo largo de las tres horas de incubación a 39°C. Para ello se realizó un análisis de varianza para las variables vivos, móviles totales y móviles progresivos utilizando un modelo con los efectos fijos de CLC (control, negativo, clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg), horas (0 y 1h), su interacción doble y el efecto aleatorio de eyaculado (1-15) (Procedimiento Mixed; SAS Institute Inc., versión 9.0 2002). En este caso no fue necesario transformar la variable vivos.

3. RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN DE LA FASE DE ADICIÓN DE LA CICLODEXTRINA (I)

3.1.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación

El tratamiento de los espermatozoides con CLC al inicio (clc Inicio) o al final (clc Final) de la fase de incubación a 16°C no mejoró el porcentaje de espermatozoides que sobreviven al proceso de crioconservación (porcentaje de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos). Cuando las muestras fueron tratadas con CLC al final de la fase de incubación a 16°C se observó un descenso significativo en el porcentaje de espermatozoides vivos con respecto a las muestras control (40 vs 31%; $P < 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación, cuando los espermatozoides son tratados con CLC (ciclodextrinas saturadas de colesterol) al inicio de la incubación a 16°C (clcInicio), al final de la fase de incubación (clcFinal) o no son tratados (control)

| CLC | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|------------|-------------|-----------------|-----------------------|
| control | 20 ± 4,6 | 17 ± 4,2 | 40 ^A ± 3,4 |
| clc Inicio | 20 ± 4,6 | 17 ± 4,2 | 38 ^A ± 3,4 |
| clc Final | 19 ± 4,6 | 17 ± 4,2 | 31 ^B ± 3,4 |

^{A, B} Valores en la misma columna con distintos superíndices son diferentes $P < 0,05$.

Los porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y móviles progresivos fueron significativamente mayores cuando las muestras fueron congeladas a bajas concentraciones (150×10^6 espermatozoides/mL) ($P < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides (spz) móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación cuando los espermatozoides son diluidos hasta diferentes concentraciones de congelación: alta (10^9 spz/mL) o baja (150×10^6 spz/mL)

| CONCENTRACIÓN | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| alta | 12 ^B ± 4,5 | 10 ^B ± 4,1 | 28 ^B ± 3,2 |
| baja | 27 ^A ± 4,5 | 23 ^A ± 4,1 | 45 ^A ± 3,2 |

^{A, B} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$).

La supervivencia de los espermatozoides al proceso de crioconservación siempre fue mayor cuando se utilizaron las concentraciones bajas de congelación independientemente de que fueran tratadas o no con CLC (Datos no mostrados, $P > 0,05$).

3.1.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la incubación a 39°C

Se observó una disminución significativa de los porcentajes de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos durante la incubación a 39°C ($P < 0,05$) (Tabla 3), independientemente del tratamiento con CLC empleado (Datos no mostrados, $P > 0,05$). No obstante las muestras congeladas a 10^9 espermatozoides/mL mantuvieron sus valores de motilidad total debido a los bajos porcentajes que presentaron desde el inicio de la incubación ($P < 0,05$) (Tabla 4).

Tabla 3. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C

| HORAS | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) |
|-------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 20 ^A ± 3,0 | 17 ^A ± 2,6 |
| 1 | 14 ^B ± 3,0 | 10 ^B ± 2,6 |
| 3 | 6 ^C ± 3,0 | 2 ^C ± 2,6 |

^{A, B, C} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$).

Tabla 4. Porcentajes de espermatozoides (spz) móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación y la incubación en baño de agua a 39°C cuando los espermatozoides son diluidos hasta diferentes concentraciones de congelación (alta 10^9 spz/mL o baja 150×10^6 spz/mL) y las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación a 39°C

| CONCENTRACIÓN | HORAS | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) |
|---------------|-------|-----------------------|-----------------------|
| Baja | 0 | 27 ^A ± 3,2 | 23 ^A ± 2,8 |
| | 1 | 19 ^B ± 3,2 | 14 ^B ± 2,8 |
| | 3 | 8 ^D ± 3,2 | 3 ^E ± 2,8 |
| Alta | 0 | 12 ^C ± 3,2 | 10 ^C ± 2,8 |
| | 1 | 9 ^{CD} ± 3,2 | 6 ^D ± 2,8 |
| | 3 | 3 ^E ± 3,2 | 1 ^E ± 2,8 |

^{A, B, C, D, E} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

Teniendo en cuenta los resultados de este experimento, en el resto de experimentos se utilizó la concentración baja de congelación pudiendo realizar así un mayor número de tratamientos por eyaculado. Dado que no se observaron mejoras en la supervivencia a la crioconservación con las fases de adición evaluadas, el momento óptimo de adición de las CLC se siguió estudiando en el segundo experimento.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA FASE DE ADICIÓN DE LA CICLODEXTRINA (II)

3.2.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación

Los porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y móviles progresivos en el momento de la descongelación fueron similares para las muestras tratadas con las CLC después de centrifugar (clcD) y las muestras no tratadas (control). Los espermatozoides que incubaron con las CLC antes de centrifugar (clcA) presentaron unos porcentajes de espermatozoides vivos y móviles totales significativamente menores que los que no fueron tratados con colesterol ($P < 0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación, cuando los espermatozoides son tratados con CLC (ciclodextrinas saturadas de colesterol) antes de la centrifugación (clc A), después de la centrifugación (clc D) o no son tratados (control)

| CLC | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|---------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| control | 36 ^A ± 4,1 | 32 ^{AB} ± 3,9 | 49 ^A ± 2,9 |
| clc A | 32 ^B ± 4,1 | 28 ^B ± 3,9 | 43 ^B ± 2,9 |
| clc D | 38 ^A ± 4,1 | 34 ^A ± 3,9 | 47 ^A ± 2,9 |

^{A, B} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

La motilidad total y progresiva no disminuyó significativamente cuando las muestras fueron incubadas con medio LEY en lugar de con plasma seminal o no descendieron lentamente hasta los 16°C (Tabla 6), independientemente de si fueron tratadas o no con CLC (Datos no mostrados, $P > 0,05$).

Tabla 6. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación cuando los espermatozoides sufren diferentes tipos de incubación a 16 °C (con plasma, con medio lactosa-yema de huevo (LEY) o no sufren incubación a 16°C)

| INCUBACIÓN | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|----------------|-------------|-----------------|-----------|
| con plasma | 37 ± 4,1 | 33 ± 3,9 | 45 ± 2,9 |
| con medio LEY | 35 ± 4,1 | 32 ± 3,9 | 46 ± 2,9 |
| sin incubación | 33 ± 4,1 | 29 ± 3,9 | 47 ± 2,9 |

^{A, B} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

3.2.2 Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la incubación a 39°C

A lo largo de la incubación a 39°C la supervivencia de los espermatozoides disminuyó significativamente ($P < 0,05$) (Tabla 7) independientemente del tipo de tratamiento con CLC o del tipo de incubación a 16°C sufrido (Datos no mostrados, $P > 0,05$).

Tabla 7. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C

| HORAS | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) |
|-------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 35 ^A ± 2,8 | 32 ^A ± 2,3 |
| 1 | 24 ^B ± 2,8 | 17 ^B ± 2,3 |
| 3 | 6 ^C ± 2,8 | 1 ^C ± 2,3 |

A, B, C Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

De acuerdo con los resultados obtenidos, en los siguientes experimentos se utilizó la incubación con plasma seminal (dado que éste es el procedimiento habitual y el tratamiento con CLC no había conseguido mejorar significativamente la supervivencia de los espermatozoides sin utilizar este tipo de incubación) y la fase de adición de las CLC antes de centrifugar (clcA) por facilidad de manejo, ya que en la incubación con plasma se observaron porcentajes similares entre los espermatozoides tratados antes o después de la centrifugación.

3.3. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE CICLODEXTRINA MÁS ADECUADO (α , β ó γ - CICLODEXTRINAS)

3.3.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación

Ninguno de los tipos de ciclodextrina estudiados mejoró la supervivencia de los espermatozoides tras la crioconservación. Los espermatozoides tratados con beta-ciclodextrina presentaron unos porcentajes de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos significativamente menores que el resto ($P < 0,05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la congelación cuando los espermatozoides son tratados con diferentes tipos de ciclodextrinas saturadas de colesterol ó CLC (α -ciclodextrina (clc alfa), β -ciclodextrina (clc beta), γ -ciclodextrina (clc gamma), hydroxypropyl- α -ciclodextrina (clc hpalfa), 2HBCDcol (clc hpbeta) y 2-hydroxypropyl- γ -ciclodextrina (clc hpgamma), con ciclodextrinas no saturadas de colesterol (control negativo) o no son tratados (control).

| CLC | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| control | 31 ^A ± 5,4 | 28 ^A ± 4,9 | 55 ± 3,0 |
| negativo | 28 ^A ± 5,4 | 24 ^A ± 5,0 | 55 ± 3,1 |
| clc alfa | 33 ^A ± 5,4 | 30 ^A ± 4,9 | 53 ± 3,0 |
| clc beta | 20 ^B ± 5,4 | 17 ^B ± 5,0 | 48 ± 3,1 |
| clc gamma | 32 ^A ± 5,4 | 29 ^A ± 4,9 | 51 ± 3,0 |
| clc hpalfa | 28 ^A ± 5,4 | 26 ^A ± 4,9 | 53 ± 3,0 |
| clc hpbeta | 29 ^A ± 5,4 | 26 ^A ± 4,9 | 53 ± 3,0 |
| clc hpgamma | 28 ^A ± 5,4 | 26 ^A ± 4,9 | 55 ± 3,0 |

^{A, B} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

3.3.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación e incubación a 39°C

Los porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y móviles progresivos descendieron significativamente durante la incubación a 39°C ($P < 0,05$) (Tabla 9), independientemente del tipo de tratamiento sufrido (Datos no mostrados, $P > 0,05$).

Tabla 9. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C

| HORAS | MÓVILES | PROGRESIVOS | VIVOS |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 29 ^A ± 4,3 | 26 ^A ± 4,0 | 53 ^A ± 2,2 |
| 1 | 21 ^B ± 4,3 | 17 ^B ± 4,0 | 32 ^B ± 2,2 |
| 3 | 13 ^C ± 4,3 | 9 ^C ± 4,0 | 25 ^C ± 2,2 |

^{A, B, C} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes (P < 0,05)

Puesto que ninguna de las ciclodextrinas mejoró los resultados con respecto al control, se planteó la posibilidad de que la concentración de CLC utilizada no fuese la óptima para esta especie. Así, en el resto de experimentos se estudió la concentración óptima de CLC para los espermatozoides de verracos. Además, se decidió utilizar la metil-b-ciclodextrina saturada de colesterol en los siguientes experimentos dado que es una de las ciclodextrinas más utilizada en otras especies, una de las más económicas y una de las más sencillas de preparar.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CICLODEXTRINA (I)

3.4.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la fase de incubación a 16°C

Tras analizar las muestras incubadas a 16°C no se desechó ninguna muestra por posible toxicidad de las concentraciones más altas de ciclodextrina o CLC, aunque se observó una clara disminución en los porcentajes de motilidad total y progresiva de las muestras tratadas con 6 mg o más de CLC o ciclodextrina no saturada de colesterol. Las muestras control presentaron un porcentaje de espermatozoides móviles progresivos significativamente menor que las muestras tratadas con 1-3 mg de CLC ó con 3mg de ciclodextrina no saturada de colesterol ($P < 0,05$) (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la incubación a 16°C cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 1 mg, clc 2 mg, clc 3 mg, clc 6 mg ó clc 12 mg), con diferentes concentraciones de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo 2 mg, negativo 3 mg ó negativo 6 mg) o no son tratados (control)

| CLC | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) |
|--------------|------------------------|------------------------|
| control | 66 ^{AB} ± 5,3 | 44 ^B ± 6,4 |
| negativo 2mg | 74 ^A ± 5,3 | 49 ^{AB} ± 6,4 |
| negativo 3mg | 74 ^A ± 5,3 | 53 ^A ± 6,4 |
| negativo 6mg | 60 ^{BC} ± 5,3 | 42 ^B ± 6,4 |
| clc 1mg | 76 ^A ± 5,3 | 56 ^A ± 6,4 |
| clc 2 mg | 65 ^A ± 5,3 | 54 ^A ± 6,4 |
| clc 3mg | 64 ^{AB} ± 5,3 | 56 ^A ± 6,4 |
| clc 6mg | 50 ^C ± 5,3 | 47 ^{AB} ± 6,4 |
| clc 12mg | 35 ^D ± 5,3 | 31 ^C ± 6,4 |

A, B, C, D Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

3.4.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación

Los espermatozoides tratados con 1 mg de CLC presentaron unos porcentajes de espermatozoides vivos significativamente mayores que los espermatozoides no tratados (+8%; $P < 0,05$). Asimismo, presentaron unos porcentajes de espermatozoides móviles totales y progresivos mayores (+4%) que las muestras control, aunque estas diferencias no fueron significativas. La adición de 2 mg de CLC también mejoró los porcentajes de espermatozoides vivos con respecto a las muestras control (+5%), aunque esta diferencia no fue significativa. Las muestras tratadas con 6 mg ó 12 mg de CLC o con 6 mg de CD presentaron unos porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y móviles progresivos significativamente menores que el resto de tratamientos ($P < 0,05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la congelación cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 1 mg, clc 2 mg, clc 3 mg, clc 6 mg ó clc 12 mg), con diferentes concentraciones de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo 2 mg, negativo 3 mg ó negativo 6 mg) o no son tratados (control)

| CLC | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|--------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| control | 28 ^A ± 4,0 | 26 ^{AB} ± 3,9 | 53 ^B ± 3,5 |
| negativo 2mg | 30 ^A ± 4,0 | 28 ^{AB} ± 3,9 | 54 ^{AB} ± 3,5 |
| negativo 3mg | 25 ^{AB} ± 4,0 | 22 ^{BC} ± 3,9 | 51 ^{BC} ± 3,5 |
| negativo 6mg | 20 ^{BC} ± 4,0 | 18 ^{CD} ± 3,9 | 38 ^D ± 3,5 |
| clc 1mg | 32 ^A ± 4,0 | 30 ^A ± 3,9 | 61 ^A ± 3,5 |
| clc 2mg | 25 ^{AB} ± 4,0 | 23 ^{ABC} ± 3,9 | 58 ^{AB} ± 3,5 |
| clc 3mg | 19 ^{BC} ± 4,2 | 17 ^{CD} ± 4,0 | 53 ^B ± 3,5 |
| clc 6mg | 13 ^{CD} ± 4,2 | 11 ^{DE} ± 4,0 | 39 ^{CD} ± 3,5 |
| clc 12mg | 9 ^D ± 4,0 | 8 ^E ± 4,0 | 21 ^E ± 3,5 |

A, B, C, D, E Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes (P< 0,05)

3.4.3. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación e incubación a 39°C

Los porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y progresivos disminuyeron significativamente durante la incubación a 39°C (P<0,05) (Tabla 12), independientemente de si fueron tratados o no con CLC (Datos no mostrados, P>0,05).

Tabla 12. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C

| HORAS | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 22 ^A ± 2,2 | 20 ^A ± 1,8 | 47 ^A ± 2,5 |
| 1 | 16 ^B ± 2,2 | 13 ^B ± 1,8 | 30 ^B ± 2,5 |
| 3 | 7 ^C ± 2,2 | 2 ^C ± 1,8 | |

A, B, C Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes (P < 0,05)

3.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CICLODEXTRINA (II)

3.5.1. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la fase de incubación a 16°C

No se descartó ninguna de las muestras tras la observación de la motilidad total y progresiva después del descenso de temperatura a 16 °C. Las muestras tratadas con 1,5 ó 2 mg de CLC presentaron un porcentaje de espermatozoides móviles totales significativamente menores que las tratadas con 0,5 mg de CLC ($P < 0,05$), sin embargo fueron las muestras no tratadas y las tratadas con ciclodextrina no saturada de colesterol las que presentaron los menores porcentajes de espermatozoides móviles progresivos ($P < 0,05$) (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la incubación a 16°C cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg), con 1mg de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo) o no son tratados (control)

| CLC | MÓVILES (%) | PROGRESIVOS (%) |
|------------|-------------------------|------------------------|
| control | 72 ^{AB} ± 4,5 | 39 ^C ± 5,4 |
| negativo | 72 ^{AB} ± 4,5 | 42 ^{BC} ± 5,4 |
| clc 0,5 mg | 75 ^A ± 4,5 | 49 ^A ± 5,4 |
| clc 1 mg | 69 ^{ABC} ± 4,5 | 49 ^A ± 5,4 |
| clc 1,5 mg | 68 ^{BC} ± 4,5 | 48 ^{AB} ± 5,4 |
| clc 2 mg | 63 ^C ± 4,5 | 49 ^A ± 5,4 |

A, B, C Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes ($P < 0,05$)

3.5.2. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides inmediatamente tras la descongelación

Los espermatozoides tratados con 1 mg de CLC mostraron los mayores porcentajes de espermatozoides vivos ($\pm 5\%$ con respecto al control) aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros analizados (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la congelación cuando los espermatozoides son tratados con diferentes concentraciones de ciclodextrina saturada de colesterol (clc 0,5 mg, clc 1 mg, clc 1,5 mg y clc 2 mg), con 1mg de ciclodextrina no saturada de colesterol (negativo) o no son tratados (control)

| CLC | MOVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS |
|------------|-------------|-----------------|----------|
| control | 24 ± 3,2 | 21 ± 2,9 | 52 ± 2,6 |
| negativo | 26 ± 3,2 | 23 ± 2,9 | 50 ± 2,6 |
| clc 0,5 mg | 26 ± 3,2 | 21 ± 2,9 | 53 ± 2,6 |
| clc 1 mg | 23 ± 3,2 | 19 ± 2,9 | 57 ± 2,6 |
| clc 1,5 mg | 22 ± 3,2 | 18 ± 2,9 | 53 ± 2,6 |
| clc 2 mg | 21 ± 3,2 | 17 ± 2,9 | 49 ± 2,6 |

^{A, B} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes (P < 0,05)

3.5.3. Efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides tras la descongelación e incubación a 39°C

La supervivencia de los espermatozoides disminuyó significativamente durante la incubación a 39°C (P<0,05) (Tabla 15), independientemente del tratamiento recibido (Datos no mostrados, P>0,05).

Tabla 15. Porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos después de la descongelación e incubación en baño de agua a 39°C cuando las muestras son observadas a las 0, 1 y 3 horas durante la incubación 39°C

| HORAS | MOVILES (%) | PROGRESIVOS (%) | VIVOS (%) |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 24 ^A ± 2,6 | 20 ^A ± 2,4 | 53 ^A ± 1,9 |
| 1 | 17 ^B ± 2,6 | 12 ^B ± 2,4 | 34 ^B ± 1,9 |

^{A, B, C} Valores en la misma columna con distintos superíndices, son diferentes (P < 0,05)

4. DISCUSIÓN

Alrededor de un 50% de la población de espermatozoides resulta irreversiblemente dañada cuando es sometida a los procesos de crioconservación actuales (Watson, 2000). Además, un gran porcentaje de los espermatozoides que sobreviven a la congelación presentan daños subletales que limitan o impiden el proceso de fecundación o de desarrollo embrionario. Los espermatozoides crioconservados presentan una reducida longevidad en el tracto reproductor femenino y/o un transporte espermático alterado. Como consecuencia de estos fenómenos, el número de espermatozoides crioconservados incluidos en las dosis debe ser incrementado, o la inseminación tiene que ser realizada profundamente en el tracto reproductor femenino y/o cercana al momento de la ovulación. Así, cuando se utiliza el método de inseminación clásico (inseminación cervical), es necesario utilizar altas concentraciones de espermatozoides en las dosis de congelación para conseguir una inseminación artificial exitosa (Holt, 2000). Otros autores han conseguido buenos porcentajes de fertilidad tras el uso de espermatozoides congelados utilizando la inseminación transcervical uterina profunda y realizando un control exhaustivo del momento de la ovulación (Roca et al., 2003).

Los protocolos habituales de congelación en porcino utilizan una concentración de congelación de 10^9 espermatozoides/mL. Woelders et al (2004) observaron un aumento en los porcentajes de supervivencia de espermatozoides de cerdo congelados con medio BTS-yema de huevo a una concentración de 150×10^6 espermatozoides/mL (con respecto a espermatozoides congelados a 1500×10^6) y unos porcentajes de supervivencia similares entre estas concentraciones si el medio utilizado era lactosa-yema de huevo. En el presente trabajo se observó que la congelación del semen de verraco a 150×10^6 espermatozoides/mL no solo no era perjudicial, sino que presentó unos porcentajes de espermatozoides vivos, móviles totales y móviles progresivos mayores que la concentración de congelación habitual. La célula espermática sufre diversos cambios de volumen a lo largo del proceso de crioconservación. En el momento de la congelación estos cambios son debidos al estrés osmótico producido por la congelación del agua intra y extracelular, de manera que la membrana requiere de un grado de desplazamiento para poder acomodarse a estas variaciones de volumen (Watson, 2000). Hernández et al. (2007) observaron mediante criomicroscopía electrónica en una pajuela durante el proceso de congelación, que los lagos formados por el hielo extracelular, que ocupaban un 80 % de la superficie, comprimían las bandas de diluyente concentrado en las que se encontraban los espermatozoides. Así, la utilización de altas concentraciones de congelación podría suponer que dentro de cada una de estas bandas se encuentre un gran número de espermatozoides, de manera que el reducido espacio que queda entre las células no permita la acomodación de la membrana espermática a los cambios de volumen anteriormente citados. En el resto de experimentos se utilizó la concentración baja de congelación ya que permitiría realizar un mayor número de tratamientos por eyaculado, aunque serían necesarios más trabajos para confirmar esta mejora.

Una de las estructuras más afectada por el descenso de temperatura y los cambios osmóticos que se producen durante el proceso de congelación es la membrana plasmática. Los cambios de organización lipídica que sufre la membrana son dependientes de la temperatura y se producen por la transición de fase líquida a gel de los fosfolípidos que la componen. El colesterol juega un papel muy importante en la regulación de estos fenómenos debido a que interactúa con los fosfolípidos alterando su comportamiento de cambio de fase (Watson, 1981). Los espermatozoides de la especie porcina presentan un bajo ratio colesterol/fosfolípidos en su membrana y, por ello, son muy susceptibles al descenso de temperatura (Holt, 2000).

Una manera sencilla de incrementar el contenido en colesterol de la membrana de los espermatozoides es el tratamiento con CLC. *A priori*, y tal como se observa en otras especies con bajo ratio colesterol/fosfolípidos (caballos, toros, moruecos, burros y caprinos), el uso de CLC debería mejorar la supervivencia a la crioconservación de los espermatozoides de verraco.

Existen pocos trabajos realizados para el estudio de la congelación de semen porcino con ciclodextrinas y sus resultados resultan contradictorios. Zeng y Terada (2000; 2001a; 2001b) observaron que el tratamiento de los espermatozoides de un solo verraco con ciclodextrinas no saturadas de colesterol (metil- β -ciclodextrina o 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina) mejoraba los resultados tras la congelación, mientras que el suplemento de colesterol al medio resultaba en un empeoramiento. Sin embargo, Galantino-Homer et al. (2006) realizaron un estudio utilizando 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y colesterol para el tratamiento de los espermatozoides y observaron un incremento de la viabilidad post-cold shock con respecto a los espermatozoides no tratados o tratados únicamente con la ciclodextrina. En el trabajo de Zeng y Terada emplearon un solo macho sin tener en cuenta la alta variabilidad para la congelación que existe entre individuos y, además, el tratamiento de los espermatozoides con las ciclodextrinas se realizó en presencia de yema de huevo, hecho que afecta a la transferencia de colesterol desde las ciclodextrinas hacia los espermatozoides, ya que se produce intercambio de colesterol entre las ciclodextrinas y el medio (Purdy y Graham, 2004). Además, los autores no determinaron la cantidad de colesterol que contenía la membrana de los espermatozoides antes y después del tratamiento con ciclodextrina, con lo que se desconoce si en realidad se produjo adición o eliminación de colesterol. Por otro lado, se ha demostrado en varios estudios en otras especies que el tratamiento de los espermatozoides con CLC previamente a la congelación mejora el porcentaje de espermatozoides que sobreviven al proceso. Así, esta mejora se ha observado en caballos (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005; Zahn et al., 2002), en burros (Alvarez et al., 2006), en toros (Purdy y Graham, 2004; Mocé y Graham, 2005), en moruecos (Morrier et al., 2004; Mocé et al., 2006, datos no publicados) y en caprino (Barrera-Compean et al., 2005).

Algunos autores observaron que los espermatozoides de porcino son muy susceptibles al cold-shock inmediatamente tras la eyaculación, pero que su resistencia aumenta (en un 50-80% de los espermatozoides) si los espermatozoides son incubados durante unas horas junto al plasma seminal (Watson, 1982).

Si la incubación con CLC dotara de mayor resistencia a la membrana de los espermatozoides de porcino, el paso de incubación con plasma seminal

podría ser eliminado del protocolo de congelación, asemejándolo al del resto de especies. Los espermatozoides incubados a 16°C junto a medio lactosa-yema de huevo y los espermatozoides llevados directamente a 5°C sin pasar por la fase de enfriamiento lento a 16°C presentaron porcentajes de viabilidad o motilidad similares a los espermatozoides congelados con el protocolo habitual (incubados con plasma seminal a 16°C) independientemente de que fueran tratados o no con CLC.

Dado que el protocolo de congelación de la especie porcina es muy diferente al del resto de especies (que no necesitan la fase de enfriamiento lento hasta 16°C), fue necesario adaptar el protocolo de adición de las ciclodextrinas generalmente utilizado en los estudios nombrados anteriormente, comenzando por determinar cuál era el momento más adecuado para la incubación de los espermatozoides con las ciclodextrinas. Purdy y Graham (2004) observaron que los espermatozoides de toro experimentaban el efecto beneficioso de la incubación con CLC tanto si la adición se producía a 37°C como a 22°C y que alargar la incubación de los espermatozoides con las CLC más allá de los 15 minutos tampoco mejoraba los resultados obtenidos. Sin embargo, Álvarez et al. (2006) observaron que la temperatura idónea de adición de las CLC a los espermatozoides de burro era 20°C (en comparación con la adición a 37°C). La incubación de los espermatozoides de porcino con CLC al inicio o al final de la fase de incubación a 16°C no resultó en un incremento de la supervivencia a la crioconservación de los espermatozoides. Tampoco mejoraron los porcentajes de viabilidad, motilidad total o motilidad progresiva al tratar los espermatozoides con CLC antes o después de la centrifugación. Estos resultados contradictorios con respecto a los observados en otras especies pueden ser consecuencia de la mala elección del tipo de ciclodextrina, de una concentración de ciclodextrina inadecuada o puede que sean necesarios un periodo de incubación más largo o una temperatura de incubación más alta. La ciclodextrina elegida en nuestros experimentos fue la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, ya que ésta es la que mejores resultados produce en algunas especies (moruecos). Además, esta es la ciclodextrina utilizada en la mayoría de los trabajos en porcino, ya que se ha observado que la exposición prolongada de los espermatozoides de porcino a la metil- β -ciclodextrina (que es la más utilizada en otras especies) puede afectar a su viabilidad e integridad de membrana a concentraciones que son toleradas por células somáticas (Van Gestel et al., 2005). La concentración elegida fue la empleada en el resto de especies (2 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides).

Mocé et al. (2006, datos no publicados) observaron que en los espermatozoides de caballos la adición de CLC antes de la centrifugación ofrecía porcentajes de espermatozoides móviles y vivos ligeramente más elevados que cuando la adición se producía después de la centrifugación. Sin embargo, en nuestro trabajo se observaron peores porcentajes de espermatozoides que sobreviven a la congelación cuando las muestras fueron tratadas justo antes de la centrifugación (tratamiento con “*clc final*” en incubación a 16°C con plasma seminal, tratamiento con “*clc A*” en incubación a 16°C con medio LEY y tratamiento con “*clc A*” cuando no hay incubación a 16°C; datos no mostrados; Figura 6). Estos resultados pueden indicar que es perjudicial para el espermatozoide de porcino centrifugar inmediatamente después de los 15 minutos de incubación con las CLC y que es necesario más tiempo de equilibrado con el colesterol antes de someterlos al proceso de

centrifugación. La eficiencia en la transferencia de colesterol de las ciclodextrinas depende, entre otros factores, de la duración de la exposición de la célula al complejo ciclodextrina-colesterol (Zidovetzi y Levitan, 2007). Levitan et al. (2000) observaron que el contenido en colesterol de la célula del endotelio aórtico bovino expuesta durante 30 minutos a la ciclodextrina saturada de colesterol, aumentaba significativamente, y que, exposiciones más largas no presentaban mayores diferencias. Asimismo, Purdy y Graham (2004) observaron que un tiempo de incubación de 15 minutos con las CLC era suficiente para los espermatozoides de toro, sin embargo, durante el proceso de congelación habitual de esta especie, los espermatozoides no son sometidos a centrifugación. Con el protocolo habitual de congelación de semen de porcino (incubación a 16°C con plasma seminal) el tratamiento con CLC de elección es la adición al inicio de la fase de incubación a 16°C ya que así los espermatozoides ya han sido reforzados cuando se produce el descenso de temperatura de 22°C a 16°C, periodo en el que se producen los cambios de fase en los fosfolípidos de la membrana espermática y, como consecuencia, su desestructuración y pérdida de funcionalidad.

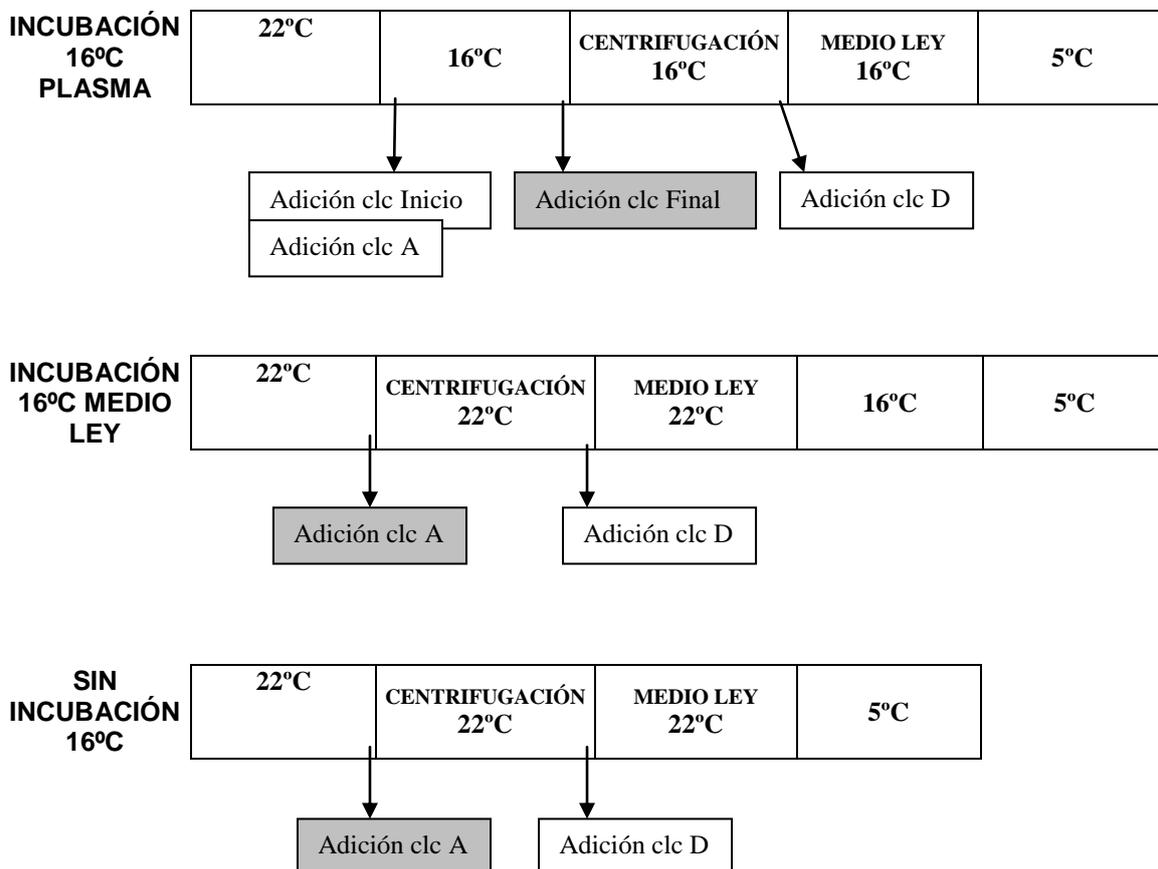


Figura 6: Diferentes tratamientos con CLC utilizados en: espermatozoides incubados a 16°C con plasma seminal, en espermatozoides incubados a 16°C con medio lactosa-yema de huevo (medio LEY) o en espermatozoides que no son sometidos a la incubación a 16°C

Puesto que la adición de 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina saturada de colesterol a los espermatozoide de verraco no mejoró su supervivencia tras la

descongelación, se procedió a determinar cuál era el tipo de ciclodextrina más adecuado para modificar la cantidad de colesterol en la membrana de los espermatozoides de esta especie. En este trabajo no se observaron diferencias entre las α , β ó γ ciclodextrinas o los hidratos de α , β o γ ciclodextrina. Los espermatozoides de porcino tratados con β -ciclodextrinas saturada de colesterol presentaron los porcentajes más bajos para todos los parámetros estudiados. Estos resultados corroboran los obtenidos por Pitha et al. (1988) en los que observaron que las ciclodextrinas no modificadas, como la α - o β -ciclodextrina, presentan una solubilidad limitada en soluciones acuosas, lo que puede afectar a la eficiencia en la transferencia de colesterol. Esta capacidad para transferir colesterol a la membrana de los espermatozoides puede mejorar al incluir residuos metilo o hidroxipropilo en los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas, ya que aumenta su solubilidad en agua y su capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos (Yancey et al., 1996). Cuando los espermatozoides de porcino fueron tratados con hidroxipropil- α -, 2-hidroxipropil- β - ó 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina saturadas de colesterol presentaron un menor descenso de motilidad tras una hora de incubación a 39°C (Datos no mostrados). Mocé et al. (2006, datos no publicados) observaron que cuando los espermatozoides de morueco son tratados con ciclodextrina no saturada de colesterol, disminuyen sus porcentajes de motilidad total (-12%) y progresiva (-9%) con respecto a los espermatozoides no tratados. Sorprendentemente, en nuestro estudio, el tratamiento con la ciclodextrina no saturada de colesterol, que, a priori, eliminaría colesterol de la membrana del espermatozoide y aumentaría su susceptibilidad al cold shock, no resultó en una menor supervivencia a la congelación que los espermatozoides no tratados o los tratados con CLC. Zeng y Terada (2000; 2001a; 2001b) también observaron que el tratamiento con metil- β -ciclodextrina o 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina no saturadas de colesterol mejoraba los resultados post-congelación en semen de verraco. No obstante, en estos trabajos la incubación de los espermatozoides con las ciclodextrinas se realizó en presencia de yema de huevo, produciéndose posiblemente transferencia de colesterol de la yema hacia el espermatozoide a través de la ciclodextrina, como se ha indicado previamente. En posteriores estudios realizados por Galantino-Homer et al. (2006), en los que se utilizaba la misma metodología para el tratamiento con las ciclodextrinas pero con un medio de congelación sin yema de huevo, no se observó esta mejora, ya que los espermatozoides de verraco sometidos a un tratamiento con ciclodextrina no saturada de colesterol presentaban unos porcentajes de viabilidad tras el cold-shock menores (-19%) que los espermatozoides control. Además, en un estudio realizado por Jiude Mao et al. (2005) observaron que los espermatozoides porcinos tratados con metil- β -ciclodextrina no saturada de colesterol presentaban un porcentaje de acrosomas reaccionados significativamente mayor que los no tratados.

Ante la falta de respuesta tras el tratamiento con distintas CLC a una concentración de 2 mg/120 x 10⁶ espermatozoides, en el resto de experimentos se intentó determinar cuál es la concentración de CLC óptima. Para ello se utilizó la metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol, ya que ésta es la ciclodextrina más utilizada en el resto de especies, además de presentar una mayor solubilidad en BTS (por lo tanto una buena transferencia de colesterol a las membranas) y de ser más económica.

En estos experimentos se observó que el tratamiento de los espermatozoides de verraco con más de 3 mg de CLC/ 120×10^6 espermatozoides provocaba una disminución en la supervivencia postdescongelación de los espermatozoides. Purdy y Graham (2004) observaron, en espermatozoides de toros, que cuando el contenido en colesterol aumenta de cuatro a cinco veces por encima del nivel normal éste se convierte en perjudicial para la supervivencia celular, ya que afecta a la fluidez de membrana y a su funcionalidad. El tratamiento de los espermatozoides de porcino con 1 mg ó 2 mg de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol/ 120×10^6 espermatozoides mejoró la viabilidad (+8 % y +5 %) y el tratamiento con 1 mg la motilidad total y progresiva (+4 % y +4%) tras la descongelación. Al determinar con más exactitud la concentración óptima, de nuevo fue el tratamiento con 1 mg de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol / 120×10^6 espermatozoides el que presentó mejores resultados (vivos: +5%). Esta cantidad de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol es similar a la utilizada por Purdy y Graham (2004) en toros (1,5-3 mg / 120×10^6 espermatozoides), Moore et al. (2005) en caballos (1,5 mg / 120×10^6 espermatozoides) y Barrera-Compean et al. (2005) en caprino (0,75-1,5 mg / 120×10^6 espermatozoides), todas ellas especies con un bajo ratio colesterol/fosfolípidos de membrana en sus espermatozoides y por lo tanto con mayor susceptibilidad al cold-shock. Galantino-Homer et al. (2006) obtuvieron un aumento significativo (+31%) en la supervivencia tras cold-shock de los espermatozoides de verraco utilizando 3,144 mg de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y colesterol/ 120×10^6 espermatozoides. No obstante, no es apropiado comparar directamente los resultados de este estudio con el presente trabajo ya que Galantino-Homer et al. (2006) utilizaron metodologías diferentes, tanto para la saturación de colesterol de las ciclodextrinas y su adición a los espermatozoides, como para el protocolo de inducción de cold shock (medio de congelación no capacitante sin yema de huevo Tardif et al. (2003), cold-shock inducido mediante incubación en baño de agua a 10°C durante 10 minutos sin completar el protocolo de congelación y descongelación). Por otro lado, los incrementos observados en los porcentajes de espermatozoides vivos y móviles totales no alcanzan los obtenidos en estudios realizados en otras especies en los que se utilizan los mismos procedimientos de saturación de colesterol y de adición de las CLC: en toros, +15-18 % espermatozoides móviles totales y 9-14% espermatozoides vivos (Purdy y Graham, 2004); en caballos, +10-19% espermatozoides móviles totales y +9-21% espermatozoides vivos (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005); en burros, +11-15% espermatozoides móviles totales y +7-9% espermatozoides vivos (Álvarez et al., 2006); en moruecos, +15-17% espermatozoides móviles totales y +15-23% espermatozoides vivos (Mocé et al., 2006, datos no publicados). Quizá, la mejora obtenida en porcino pueda aumentar hasta dichos niveles una vez determinado el protocolo completo de adición de CLC, ya que en futuros experimentos se volverá a determinar el tipo de CLC adecuada utilizando la concentración de 1 mg/ 120×10^6 espermatozoides, se determinará el contenido de colesterol en la membrana antes y después de la adición de CLC y también se compararán otros crioprotectores más permeables y otros diluyentes de congelación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez AL, Serres C, Torres P, Crespo F, Mateos E, Gómez-Cuétara C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2006;94:89-91.
- Amann RP. Cryopreservation of sperm. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Volume 1. Academic Press, 1999:773-783.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a gamaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, 2000;21:1-7.
- Barrera-Compean MH, Purdy PH, Dzakuma JM, Newton GR, Nuti LC. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves post-thaw goat sperm motility. *J Anim Sci Suppl* 2005;83;suppl 1;153.
- Bracken CJ. Effect of time of ovulation and sperm concentration on fertilization rate in gilts. *Theriogenology*, 2003;60:669-676.
- Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*, 2000;56:127-132.
- Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl*, 2004;25:389-396.
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Research*, 1997;38:2264-2272.
- Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vázquez JM, Martínez EA. Kinematic changes during cryopreservation of boar spermatozoa. *J Androl*, 2005;26:610-618.
- Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 2000;5:46-52.
- Darin Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 1977;14:466-470.
- Eriksson BM, Petersson H, Rodríguez-Martínez H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 2002;58:1065-79.

- Gadea J. El uso de semen porcino congelado. *Mundo ganadero*, 2004;169:60-62.
- Gadea J, Gumbao D, Matas C, Romar R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Androl*, 2005;26:749-756.
- García-Casado P, 2007. Estado actual de la congelación de semen de verraco. XXX Curso internacional de reproducción animal-INIA, Madrid, vol 1:107-113.
- Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski. Effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol Reprod Dev*, 2006;73:638-650.
- Graham JK, Purdy PH, Moore A, Mocé E. Mechanisms of cryopreservation: the effect of membrane cholesterol. *Proceedings of the 21st Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, 2006.
- Gillmore Ja, Liu J, Peter AT, Critser JK. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance of cryopreservation. *Biol Reprod*, 1998;58:28-36.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 1990;11:73-86.
- He L, Bailey JL, Buhr MM. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod*, 2001;64:69-79.
- Hernández M. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezers AI-boars. *Cryobiology*, 2007;54:63-70.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000;53:47-58.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 2000;62:3-22.
- Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 2005;63:370-382.
- Horvath G, Seidel Jr. GE. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. *Theriogenology*, 2006;66:1026-1033.

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, 2000;62:143-172.
- Levitan I, Christian AE, Tulenko TN, Rothblat GH. Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *J Gen Physiol*, 2000;115:405-416.
- Li G, Sáenz J, Godke RA, Devireddy RV. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction*, 2006;131:875-886.
- Mao J, Wu GM, Prather RS, Smith MF, Cantley T, Rieke A, Didion BA, Day BN. Effect of methyl- β -cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. *Theriogenology*, 2005;64:1913-1927.
- Mocé E, Graham JK. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, 2006;84:826-833.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Criobiology*, 2005;51:241-249.
- Morrier A, Thériault M, Castonguay F, Bailey J. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. *Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting*. Vancouver, Canadá. P239 Abstract 636.
- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Criobiology*, 1992;29:255-266.
- Pitha J, Irie T, Sklar PB, Nye JS. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci*, 1988;43:493-502.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (Lond.)*, 1949;164:666.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 2004;48:36-45.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod*, 2004;71:522-527.
- Purdy PH, Fox MH, Graham JK. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology*, 2005;51:102-112.

- Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*, 1975;40:99-102.
- Roca J. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 2003;60:77-87.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, 2006;84:2692-2699.
- Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Análisis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim*, 2003; 38:66-72.
- Statistical analysis systems. SAS user's guide. Cary, North Carolina: Statistical Analysis Systems Institute, Inc; 1985.
- Torres P, Serres C, Gómez-Cuétara C, Santiago I, Mateos E, Álvarez AL. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, 2006;94:148-151.
- Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press, 1981:189-218.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 2000;60-61:481-492.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. Zur tiefgefrierung von ebesperma: labor und besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger pailleten verfahren. *Dtsch Tieraztl Wschr*, 1975;82:261-267.
- Woelders H, Matthijs A, Zuidberg CA, Chaviero AEN. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology*, 2005;63:383-395.
- Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EPC, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem*, 1996;271:16026-16034.
- Zahn FS, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, 2002;58:237-240.
- Zeng WX, Terada T. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reprod Fertil Dev*, 2000;12:223-228.

Zeng WX, Terada T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *J Androl*, 2001;22:111-118.

Zeng WX, Terada T. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 2001;55:615-627.

Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007;1768:1311-1324.