



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**“ EFECTO DE LA VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO EN LA
CONGELABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE
PORCINO ”**

Tesis de Master

D. Jorge Daniel Juárez Moreno

Director:

D. Jordi Roca Aleu
Universidad de Murcia

Valencia, Setiembre 2009



UNIVERSIDAD DE
MURCIA



El trabajo experimental de la presente Tesis de Máster ha sido realizado en los laboratorios del Grupo de Investigación "**Reproducción Animal**" de la Universidad de Murcia.

Las experiencias realizadas para la presente Tesis de Máster han sido financiadas por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2005-00760) y la Fundación Séneca de la Región de Murcia (GERM, 04543/07).

DEDICATORIA

A Dios.

A la memoria de mi adorada madre:

María Estela

Con mucho cariño y gratitud, a mi padre:

José Daniel

A mis tesoritos, mis hijos:

Paola Estela, Claudia Sofía y

Daniel Arturo

A mi esposa y mi eterna compañera:

Elvys

A mis hermanos:

Daniel, Fernando y Martín

A mi Tíos:

Teresa, Irma y Juan

A la memoria de mis abuelos:

Alfonso, Sixta y Balbina

Y de mi tío: *Jorge*

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que hicieron posible, de alguna u otra manera, la culminación del presente trabajo. Una eterna gratitud hacia todos ellos, por ayudarme a cumplir un sueño, una meta, un anhelo.

Al **Dr. D. Jordi Roca Aleu**, director de la tesis, por la acogida, la confianza brindada, los conocimientos impartidos, sus buenos consejos, exigencias, su tiempo y paciencia. Mi aprecio y admiración hacia su persona, en lo personal y profesional.

Al **Dr. D. Emilio Martínez García**, Jefe del Area de Reproducción y Obstetricia, por permitirme ser parte de este gran grupo de investigación que dirige con una agradable carisma, que dan cuenta de una gran persona y excelente profesional.

A la **Dra. Marta Hernández Meroño**, coautora de la presente investigación, por su inmensa contribución en el poco tiempo de trabajo conjunto, tiempo suficiente para conocer la gran profesional, estupenda persona y agradable amiga que es.

A todos los amigos del "**Depa**", gracias por hacer de mi estadía una agradable experiencia y por permitirme formar parte de esta **familia**, gracias por compartir sus alegrías, penas y logros. Gracias Toñi, Jonatan, Lola, Inma, Jesús, David, Cristina, Xiomara, Sonia, David, Julián, Carolina, Carmen, María José y Toñi.

A mis amigos de **La Granja Veterinaria**, por todos los gratos momentos compartidos, la amistad brindada y por soportarme durante el tiempo que pasé con ustedes: Luis, Kassia, Willy, Cristian, Diego, Alma, Anita, Livia, Paty, Fina, Encarna, Mariano, Paco, Sandra, Maribel, Mariela, Tito, Jimena y Fernando.

A mis amigos del Máster, por el eterno apoyo, las risas compartidas y la amistad brindada, una amistad que fortalece y anima, a ustedes mis amigos: Richard, Yulixaxis, Carola, Mohamed, Andrés, Mehdi, Sofiane, Javier, Koskun y Mahmoud.

A las empresas AIM ibérica y ZASEPORC quienes gentilmente proporcionaron el material genético para la realización del presente trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Instituto Agronómico del Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), por la beca otorgada, sin la cual hubiese sido imposible la realización del presente estudio. Muchas gracias Antonio, Luis y Armando.

A las universidades que me acogieron en estos dos años de estudio, sin duda grandes universidades, debido a las grandes personas que en ella laboran: Universidad Politécnica de Valencia, Universidad Autónoma de Barcelona y a la Universidad de Murcia.

A la organización del Máster, a todos los profesores del Master y en especial a Manuel Baselga, Toñi, Jose y Agustín, por todas las enseñanzas impartidas dentro y fuera del aula de clases, por su paciencia y amistad.

A mi alma mater, la Universidad Nacional Agraria de la Selva, la Facultad de Zootecnia, donde me permitieron formarme y crecer personal y profesionalmente, a todos mis amigos, profesores y alumnos.

A mis amigos del Area de Reproducción y Mejora Genética de la Facultad de Zootecnia, por el apoyo incondicional, a Nila, Marco y Míthlon, mil gracias.

A la familia de mi esposa, la familia Cárdenas Ruiz, por su siempre desinteresado, oportuno e invaluable apoyo hacia mi familia y mi persona.

A todos mis demás familiares por el apoyo moral, animo y buenos deseos expresados siempre, y que me han estimulado a seguir muy fortalecido.

INDICE GENERAL

	Página
I. Introducción	1
- Objetivos	2
II. Revisión Bibliográfica	4
2.1. Evolución histórica de la congelación del semen de porcino	4
2.2. Criopreservación espermática: Estado actual y perspectivas futuras	6
2.3. Protocolo empleado	7
2.4. Velocidades de enfriamiento	9
2.5. Identificación de poblaciones espermáticas funcionales a la descongelación	11
2.5.1. Motilidad espermática	11
2.5.1.1. Parámetros de motilidad	14
2.5.1.2. Parámetros de velocidad	14
2.5.1.3. Parámetros de angularidad	14
2.5.1.4. Parámetros de oscilación	14
2.5.1.5. Factores que afectan la motilidad espermática	16
2.5.2. Viabilidad espermática	17
2.5.2.1. Evaluación de la viabilidad espermática	18
2.5.2.2. Evaluación de la integridad del acrosoma	20
2.5.3. Fluidez de la membrana y estado de capacitación	21
2.5.4. Peroxidación lipídica	23
2.5.5. Detección de la peroxidación lipídica	25
2.5.5.1. Medición de la producción de ROS mediante 2', 7'-diacetato de diclorhidrofluoresceína (H ₂ DCFDA)	26
2.5.5.2. Test del Acido Tiobarbiturico (TBA)	26
2.5.5.3. Uso de la quimioluminiscencia	26

2.5.5.4. Capacidad Antioxidante Total (TAC)	26
2.5.5.5. Evaluación de lipoperoxidación a través de C11-BODIPY ^{581/591}	27
III. Materiales y Métodos	28
3.1. Materiales	28
3.1.1. De los reactivos, diluyentes, medios y fluorocromos	28
3.1.1.1. Reactivos	28
3.1.1.2. Diluyentes seminales y espermáticos	28
3.1.1.3. Medios para evaluar la funcionalidad espermática	30
3.1.1.4. Fluorocromos	31
3.1.2. De los verracos y eyaculados	33
3.1.2.1. Verracos	33
3.1.2.2. Eyaculados	34
3.2. Métodos	34
3.2.1. Criopreservación espermática	34
3.2.2. Procedimientos para determinar la calidad espermática	35
3.2.2.1. Concentración espermática y porcentaje de espermatozoides con morfología normal	35
3.2.2.2. Motilidad espermática y cinética de movimiento	36
3.2.2.3. Viabilidad espermática	37
3.2.3. Procedimientos para determinar la funcionalidad espermática	38
3.2.3.1. Desestabilización de la membrana plasmática	38
3.2.3.2. Apoptosis celular	39
3.2.3.3. Determinación de la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS)	39
3.2.3.4. Volumen celular medio	41

3.3. Diseño experimental	41
3.4.- Análisis estadístico	45
IV. Resultados	46
4.1. Características espermáticas de los dos pools de semen antes de la congelación	46
4.2. Sub-poblaciones de espermatozoides móviles	47
4.3. Influencia de la velocidad de enfriamiento en el patrón de calidad espermática a lo largo del proceso de congelación-descongelación	48
4.4. Influencia de la velocidad de enfriamiento en la respuesta de los espermatozoides congelados-descongelados a un tratamiento de capacitación espermática	52
V. Discusión.	55
VI. Conclusión	67
VII. Resumen	68
Summary	69
Résumé	70
VII. Bibliografía	71

INDICE DE TABLAS

Tabla:	Página
1: Composición del diluyente espermático Beltsville Thawing Solution (BTS)	29
2: Composición del diluyente básico Tris-Glucosa-Ácido Cítrico (TGC)	29
3: Composición de los diluyentes de congelación TGC-Yema (TGC-y) y TGC-Yema-Glicerol-Equex STM (TGC-yge)	30
4: Composición del medio Tris-Buffer modificado básico (TBMb) y suplementado (TBMc)	31
5: Procedimiento empleado en las cuatro velocidades de enfriamiento evaluadas	43
6: Parámetros seminales de las dos mezclas seminales antes de la congelación	46
7. Media \pm SEM de las características de movimiento cinemático de cada una de las dos sub poblaciones espermáticas con datos provenientes del CASA	48
8. ANOVA para las fuentes de variación en los parámetros de calidad espermática de semen porcino bajo un proceso de congelado y descongelado ..	49
9. Efectos de la velocidad de enfriamiento sobre los parámetros de calidad espermática del semen A, efectuados durante el proceso de congelado y descongelado	50
10. Efectos de la velocidad de enfriamiento sobre los parámetros de calidad espermática del semen B, efectuados durante el proceso de congelado y descongelado	51
11. ANOVA para las fuentes de variación en las mediciones de funcionalidad del semen porcino post descongelado incubado en una medio capacitante	53
12. Respuesta de los espermatozoides congelados-descongelados enfriados a diferentes tasas incubados en un medio capacitante	54

INDICE DE FIGURAS

Figura:	Página
1. Digitalización de la imagen de la cabeza del espermatozoide. (Panel A) , la imagen de un espermatozoide con la elementos de la foto sobrepuestos (píxeles) que son usados para realizar el la imagen de video. (Panel B) , como "ve" la computadora la cabeza del espermatozoide después de la digitalización. Tomado de Mortimer (2000)	12
2. Representación esquemática de las muestras seminales mostrando parámetros cinéticos. Los puntos representan los puntos muestreados del CASA. ALH = Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; VSL = Velocidad rectilínea (o progresiva); VCL = Velocidad curvilínea, y VAP = Velocidad de la trayectoria media y BCF = Frecuencia de batido. Tomado de Owen y Katz (1993)	15
3. Subpoblaciones hipotéticas de espermatozoides en una muestra seminal considerada "fértil" cuando un atributo (1), dos (2), o un mayor número de atributos se miden simultáneamente. Cuando se mide un solo atributo (barra blanca) el porcentaje de espermatozoides "fértil" es sobrestimado. Adaptado de Amann and Hammerstedt (1993)	19
4. Diagrama de fluorescencia representada en FL1 por CMH ₂ DCFDA (a) y en FL3 por IP (b), donde M1 representa el porcentaje de células vivas	40
5: Muestra en cubeta con agua a 17°C, colocada en cámara fría a 5°C, velocidad de enfriamiento 0'08 °C/min	43
6: Muestra en cubeta con agua a 17°C, colocada luego en un equipo de baño circulante con descenso programado de temperatura a 5°C por 90 min, velocidad de enfriamiento 0'13 °C/min	43
7: Muestra en cubeta con agua a 17°C, colocada luego en un equipo de baño	

circulante con descenso programado de temperatura a 5°C por 30 min, velocidad de enfriamiento 0'40 °C/min	43
8: Muestra en cubeta con agua a 17°C, colocada en otra cubeta a 5 °C en cámara fría a 5°C, velocidad de enfriamiento 1'50 °C/min	43
9: Curva de descenso de temperaturas de los diversos tratamientos empleados	44

INTRODUCCION

La inseminación artificial y la criopreservación de semen son, desde hace ya unos años, las biotecnologías reproductivas más utilizadas a nivel mundial para la mejora genética en producción animal. Sin embargo, su grado de aplicación es desigual según la especie animal. En el caso del porcino, mientras más del 80 % de las cerdas en producción están a nivel mundial en programas comerciales de IA, el semen congelado-descongelado, hasta la fecha, es muy poco utilizado, apenas en el 1 % de las cerdas inseminadas (Wagner y Thibier, 2000; Roca y cols., 2006b). Este testimonial empleo contrasta con las notables ventajas, tanto sanitarias, genéticas como productivas, que ofrece el semen congelado-descongelado con respecto al fresco y/o refrigerado (Bailey y cols., 2008). Las razones de este exiguo uso, aunque son de diversa índole, todas convergen en una limitada supervivencia espermática a la descongelación y en una disminuida capacidad fecundante de los espermatozoides que sobreviven al proceso de congelación-descongelación. Estas mermas obligan a emplear un elevado número de espermatozoides congelados-descongelados por dosis de IA que además no siempre garantiza poder alcanzar la fertilidad y prolificidad que se obtienen habitualmente con el semen fresco y/o refrigerado (ver recientes revisiones de Roca y cols., 2005; 2006b; Großfeld y cols., 2008 y Rath y cols., 2009).

Con el objetivo de mejorar la supervivencia espermática a la descongelación y la capacidad fecundante de los espermatozoides supervivientes, en los últimos años se están desarrollando numerosas investigaciones para perfeccionar y optimizar los protocolos de criopreservación. En este punto no debemos olvidar que los protocolos utilizados a finales de los años 90 eran los mismos que se empleaban en los albores de la criopreservación espermática, allá por los años 70. Entre las mejoras introducidas cabe destacar aquellas que, gracias a un mayor conocimiento de los cambios que experimentan los espermatozoides en sus propiedades biofísicas durante el proceso de criopreservación (Devireddy y cols., 2004), han permitido desarrollar pautas de centrifugación menos dañinas para los espermatozoides (Carvajal y cols., 2004), diseñar envases que posibilitan una mayor homogeneidad, tanto del proceso de deshidratación como de la posterior hidratación (Ekwall y cols., 2007; Hernández y cols., 2007a) y ajustar la concentración de crioprotector o las velocidades de congelación y descongelación a las

necesidades específicas de los espermatozoides de porcino (Hernández y cols., 2007b). También han permitido identificar aditivos, principalmente antioxidantes, que adicionados al diluyente de congelación mejoran la supervivencia espermática a la descongelación (Peña et al., 2003; Gadea y cols., 2004; Roca y cols., 2004, 2005; Jeong y cols., 2009). Por último, se ha estudiado la importancia del plasma seminal en la sensibilidad de los espermatozoides de porcino para superar el estrés de la congelación y descongelación (Hernández y cols., 2007c), demostrándose que los espermatozoides procedentes de la primera porción de la fracción rica del eyaculado resisten mejor el estrés de la criopreservación (Saravia y cols., 2009a). Qué duda cabe que todos estos avances, en su conjunto, han propiciado una sustancial mejora de la supervivencia espermática a la descongelación. Actualmente podemos obtener tasas de criosupervivencia superiores al 50% en eyaculados procedentes de un número elevado de verracos (Roca y cols., 2006c).

No obstante, aún con los avances mencionados arriba, estamos todavía lejos del protocolo ideal para la congelación-descongelación de los espermatozoides de porcino. La ausencia de diluyentes químicamente definidos, eficientes y de fácil preparación para la congelación; junto con la complejidad del proceso de congelación así como su larga duración en el tiempo, limitan la aplicación de la técnica a unos pocos laboratorios especializados y con personal cualificado. Aún cuando se puedan llegar a obtener buenos resultados de fertilidad y prolificidad, el semen criopreservado no alcanzará la suficiente difusión en los programas comerciales de inseminación artificial hasta que la técnica sea lo suficientemente sencilla como para que pueda realizarse en los propios centros de inseminación artificial y por el personal técnico de los mismos. Actualmente ya se están haciendo algunos esfuerzos científicos para simplificar el proceso de criopreservación sin que ello represente ningún perjuicio para la calidad y funcionalidad espermática post-descongelación. Así, por ejemplo, es posible eliminar la tediosa etapa de la centrifugación mediante una más estricta selección de la porción del eyaculado a congelar (Saravia y cols., 2009b). El objetivo de la presente investigación es, también, intentar simplificar y reducir el tiempo del proceso de congelación. Para ello, pretendemos centrar nuestros esfuerzos en la etapa más larga, en tiempo, del proceso de la congelación-descongelación: el suave y controlado enfriamiento de los 17 °C hasta los 5 °C.

En todas las especies, incluida la porcina, los protocolos de criopreservación contemplan velocidades lentas de enfriamiento desde los 17 hasta los 5 °C, velocidades de aproximadamente entre 0'08 a 0'13 °C/min. Hipotéticamente se presupone que mayores velocidades de enfriamiento repercutirían negativamente en la calidad espermática post descongelación ya que se aumentaría la población espermática con daño en la membrana plasmática (Watson, 1981; Robertson y Watson, 1986; Robertson y cols., 1988), la producción de sustancias oxígeno reactivas por las células vivas (Vasco y cols., 2008) lo cual contribuiría a empeorar su calidad de movimiento. Y todo ello llevaría a una menor capacidad fecundante de los espermatozoides congelados-descongelados (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000; Johnson y cols., 2000). Sin embargo, estas hipótesis no están sustentadas en resultados científicos concluyentes. Hasta la fecha, pocos han sido las investigaciones que han centrado sus esfuerzos en esta etapa del proceso de criopreservación espermática, y en el caso concreto de la especie porcina, dichas investigaciones simplemente no han existido. Al respecto, tan solo son reseñables los estudios realizados en espermatozoides de vacuno por Janaskaukas y cols. (1999), quienes utilizando velocidades de enfriamiento de hasta 4-5 °C/min, obtienen una buena calidad espermática a la descongelación junto con buenas tasas de no retorno al estro en el día 56 post-inseminación. Este estudio indica claramente que los espermatozoides sometidos al proceso de congelación-descongelación son capaces de soportar velocidades más rápidas de enfriamiento, al menos en vacuno.

Entonces nuestra hipótesis de trabajo es que los espermatozoides de porcino, al igual que en vacuno, pueden soportar perfectamente velocidades de enfriamiento más rápidas para el descenso controlado de la temperatura entre los 17 °C, después de la centrifugación, y los 5 °C, momento de la adición del glicerol y posterior empaquetado. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es evaluar la respuesta de los espermatozoides de porcino sometidos al proceso de congelación-descongelación a diferentes velocidades enfriamiento en el descenso controlado de la temperatura entre los 17 y 5 °C. Dicha respuesta pretendemos evaluarla en términos de calidad y funcionalidad espermática.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Evolución histórica de la congelación del semen de porcino.

El descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol por Polge y cols., (1949) marco un significativo avance en la criopreservación de semen en las diferentes especies domésticas. Pero también se describió una peculiar sensibilidad del semen porcino al enfriamiento (Polge, 1956) y las subsecuentes investigaciones solo han hecho mejoras relativamente pequeñas a las técnicas establecidas a principios de los años '50 (Holt, 2000).

En la década de los '60 se reportó por primera vez una óptima viabilidad de semen congelado/descongelado (Bader, 1964; Rohloff, 1967), y luego de que Polge y cols (1970) lograran las primeras camadas con semen criopreservado, fueron varios los que diseñaron protocolos de criopreservación de semen porcino, pero sólo cuatro de ellos fueron los que alcanzaron los mejores resultados de viabilidad espermática, fertilidad y prolificidad. Estos fueron los establecidos por Pursel y Johnson (1975), Westendorf y cols (1975), Paquignon y Courot (1976) y Larsson y cols (1977) (revisión de Larsson, 1978). Siendo el más difundido en la actualidad el desarrollado por Westendorf y cols., (1975).

El uso de semen C-D tuvo mucho éxito en la década de los '70 en los EEUU, llegando a exportar la mitad de su producción, pero su uso descendió, presumiblemente, a la mejora en el sistema de transporte de semen fresco, el cual se hizo más rápido, pudiendo así llevar el semen fresco a mayores distancias (Crabo, 1990).

Seis conferencias internacionales en los últimos 22 años se han dedicado, exclusivamente, al mejoramiento de los métodos, proporcionando información y estimulación a la investigación sobre almacenamiento de semen porcino (*International Conferences on Boar Semen Preservation* [ICBSP] 1985, 1990, 1995, 1999, 2003, 2007). Estas conferencias surgen en Junio de 1984, cuando Kjell Larsson y Larry Johnson vieron la necesidad de juntar a los científicos y sus investigaciones de los últimos 15 años para proclamar el **estado del arte** de la crio congelación de semen porcino, realizándose la primera reunión en 1985, denominada *Deep Freezing of Boar Semen* en Uppsala (Suecia) (Theriogenology (63), 2005). A partir de la segunda reunión las conferencias pasaron a denominarse como se indicó líneas arriba, debido al hecho que involucraba

investigaciones en todos los aspectos sobre preservación del semen porcino, ya sea fresco o congelado.

Para la segunda conferencia de la Boar Semen Preservation (1990) Las expectativas del uso de semen criopreservado iban en aumento, se usaban las técnicas del pellet y las maxi-pajuelas, ambas con similar resultado en tasa de preñez (55%) y tamaño de camada, pero aún había que mejorar el número de espermatozoides por dosis (6×10^9 esperamtozoides), EEUU era el país q mas usaba la tecnología, llegando a exportar la mitad de su producción. En esta misma época (1985 – 1990), empezaron a dar mayor interés a entender mejor el rol de los crioprotectores, así Zorn (1987) (referencia de Hofmo y Almlid, 1990), observó que el Orvus Es Paste (OEP), tenía características protectivas contra el choque frío ("*cold shock*") en combinación con la yema de huevo. Así también los estudios se dirigían al desarrollo de nuevos envases para almacenar el semen, que sean fáciles de usar y conservaran mejor las características seminales. Gracias al desarrollo de los bio congeladores computarizados se hizo posible el estudio de diferentes tasas de congelación. Asi mismo el papel crioprotector del glicerol aún no estaba del todo claro, así Almlid y Johnson (1988) sugerían que el rol crioprotector del glicerol era extracelular, y que hubiese la posibilidad que las diferentes partes del espermatozoide reaccionaran de forma diferente al glicerol, así una baja concentración de glicerol da una protección óptima a las membranas internas, mientras altas concentraciones se requerían para proteger la membrana plasmática (Hofmo y Almlid, 1990).

En la 3ra conferencia de la ICBSP (1996), llevada a cabo en Mariensee – Alemania, se incluye, por primera vez, tópicos sobre la interacción esperma-ooocito y el posible uso del semen como mediador de transferencia de ADN en animales domésticos, así como se ampliaron los conocimiento sobre los aspectos técnicos y biológicos de la evaluación de semen.

La 4ta ICBSP (1999), tuvo lugar en Beltsville – Estados Unidos, estuvo marcada por el creciente uso de equipos y sistemas computarizados que facilitaban las investigaciones, asi mismo se incluyeron capítulos sobre las nuevas biotecnologías reproductivas, como la producción de embriones, clonación y producción de cerdos transgénicos así como el sexado del semen. Así para la 5ta ICBSP (2003), se realizó en

Doorwerth – Países Bajos, tuvo un formato similar a la anterior, pero se incluyeron campos emergentes como la genómica y la proteómica relacionada con la preservación de semen.

En la 6ta ICBSP (2007), desarrollada por primera vez en Alliston – Canadá, la conferencia fue dedicada a la memoria de Chris Polge, fundador de estas conferencias. Los tópicos tratados fueron muy variados, desde el desarrollo de nuevos programas inseminación con nuevos empaques, un mayor conocimiento del proceso de capacitación, revisiones sobre la situación actual del manejo de semen porcino criopreservado, mayor conocimiento en genómica y proteómica y el mayor desarrollo de biotecnologías como el sexado de semen y la clonación.

2.2. Criopreservación espermática: Estado actual y perspectivas futuras.

La inseminación artificial (AI) es una herramienta crucial en el mejoramiento genético global del porcino (Gerrits y cols., 2005); básicamente porque es la biotecnología más desarrollada y aplicada en la producción porcina (Rodríguez-Martínez, 2007), pero esta biotecnología combinada con el uso del semen congelado-descongelado (FT) es muy escasa, no llegando aún a difundirse en forma similar a la ocurrida en el vacuno.

El semen congelado está disponible comercialmente desde 1975 ya sea en pellets o en pajuelas, sin embargo, menos del 1% de todas las inseminaciones se hacen usando semen C-D, usando con más frecuencia después de la exportación de un país a otro, con el propósito primario de mejorar la base genética en un país en particular o en una granja (Johnson y cols., 2000). El uso de nuevos envases (Flat packs) con tasas de preñez y tamaños de camada similares a las reportadas con semen fresco (73% y 10.7, respectivamente), podría abrir la posibilidad de un mayor uso de la IA con semen C-D (Eriksson y cols., 2000).

El desarrollo de protocolos de criopreservación de semen comercialmente aceptables es uno de los mayores intereses de la industria porcina global (Bailey y cols., 2008). Es preciso tener en cuenta muchos factores, tales como el uso de verracos "buenos" congeladores, de sustancias antioxidantes en los medios de dilución, la inseminación próxima a la ovulación y del empleo de la inseminación intrauterina profunda

con dosis seminales de 1×10^9 espermatozoides, con el objetivo de obtener tasas de fertilidad similares a las registradas con semen fresco (Großfeld y cols., 2008).

Cabe destacar que cada vez más hay un mayor interés en la selección de verracos para los rasgos de fertilidad, pero la selección de verracos magros y musculosos y que tengan buenos parámetros seminales puede ser problemático, dado las relaciones genéticas entre los rasgos. Los métodos convencionales de mejora genética serán importantes, pero el uso de herramientas moleculares aumentará, y la identificación del potencial de la fertilidad de un verraco al nacimiento permitirá una selección más temprana y más eficiente de verracos con alta fertilidad (Safranski, 2008), en caso contrario la identificación de "malos congeladores", pero de interés sobre la biodiversidad o productivo, permitiría a los responsables de los programas reproductivos, estar alertas ante la posibilidad de usar un mayor número de pajuelas o inseminar lo más cerca posible al momento de la ovulación (Holt y cols., 2005).

2.3. Protocolo empleado.

En la década de los '70 se crearon varios protocolos de criopreservación de semen porcino, los protocolos que prevalecieron por razones económicas, tiempo empleado, prolificidad y fertilidad obtenidas fueron el "Método Belstville" de Pursel y Johnson (1975) y el "Método Hülsenberg" de Westendorf y cols. (1975). Entre los métodos mencionados existen diferencias en muchos aspectos como en la curva de congelación, el método de envasado, composición de los diluyentes utilizados para la congelación y descongelación del semen. Pursel y Johnson (1975) envasaban en píldoras de 0.2 ml a una concentración espermática de 0.6×10^9 espz/ml, mientras que Westendorf y cols (1975) usaban macro pajuelas de 6ml a una concentración de 1×10^9 espz/ml.

En una revisión realizada por Pursel y Park (1985), comparando los métodos de congelación de Pursel y Johnson (1975) y Westendorf y cols (1975), establece que un vez que las tasas óptimas de enfriado, concentración de glicerol y las condiciones de descongelación son establecidas para las maxi pajuelas, los resultados de la congelación-

descongelación serían superiores a los registrados por el método del pellet de Pursel y Johnson (1975).

Ambos protocolos incluyen en la composición de los diluyentes de congelación la yema de huevo, un detergente sintético (Orvus Es Paste) y el glicerol. Se ha reportado que la adición del OEP disminuye el daño provocado por el proceso de congelación-descongelación (Graham y cols., 1971), en concentraciones que van desde los 0.5 al 2% (Westendorf, y cols., 1975; Pursel y cols., 1978). La función del OEP está ligada a la presencia de la yema de huevo, ya que el detergente provoca la emulsión y la dispersión de los lípidos de la yema facilitando su interacción con la superficie de las membranas, lo cual parece ser esencial para que la yema realice el efecto protector esperado (revisión de Watson, 1995).

Se han utilizado alternativamente muchos agentes crioprotectores, pero sin el éxito dado por la adición del glicerol (ver revisión de Bwanga, 1991). Pero sin embargo los espermatozoides porcinos son sensibles a los efectos tóxicos del glicerol, determinándose la concentración final óptima entre 2 y 4% (Almlid y Johnson, 1988; Fiser y Fairfull, 1990), añadiéndose a los 5°C para obtener mejores resultados (Almild y Johnson, 1988). El glicerol minimiza el efecto solución, aumenta la viscosidad de las soluciones intra y extracelulares de tal manera que el agua sale de la célula con más lentitud frente a la presión ejercida por el hielo adyacente y, probablemente, además, se inserte entre los fosfolípidos de las bicapas lipídicas de las membranas espermáticas (Hammerstedt y Graham, 1992).

El uso de pajuelas de menor capacidad (1.3, 0.5 y 0.25 ml) pasó a ser de un uso más frecuente, ya que las pajuelas de 5-6 ml debido a su gran diámetro impedía una congelación homogénea (Ekwall, 2009), y se obtuvo mejores resultados post descongelación con las de menor capacidad (Almlid y Johnson, 1988; Bwanga y cols, 1990, Berger y Fischerleitner, 1992).

Una proporción substancial de los cambios en la membrana plasmática asociados con la preservación de los espermatozoides porcinos podrían atribuirse al enfriamiento de las células a 5°C, antes que al proceso mismo de congelado y descongelado. Pero si los espermatozoides se mantienen a 15°C por 3.5h durante el enfriado, la proporción de espermatozoides vivos durante el procesamiento para la criopreservación y enfriado a 5°C

no se ve afectada (Maxwell y Johnson, 1997). Es por eso que los protocolos de criopreservación de semen porcino involucran largas fases de enfriamiento, tanto desde la temperatura a la colecta del eyaculado (37°) hasta la de mantenimiento (TM) (18°, 17° o 15°C) por 4 - 3h (Eriksson y cols., 2000; Kotzias-Bandeira y cols., 1997; Guthrie y Welch, 2005). Es así que el uso de varias horas (10 – 20h) en la TM, incrementa el porcentaje de integridad de la membrana plasmática (PMI) post descongelación pero con sensible disminución de la motilidad (Kotzias-Bandeira y cols., 1997; Eriksson y cols., 2000).

2.4. Velocidades de enfriamiento.

Se conoce, hace mucho, el efecto de la sensibilidad de los espermatozoides - de varias especies domésticas - a un enfriamiento súbito de 15 a 0 °C denominado choque por frío ("cold shock"), en el cual se produce una irreversible pérdida de motilidad y actividad metabólica, pérdida de proteínas y enzimas celulares y el incremento de la permeabilidad de la membrana a las tinciones (Watson y Plummer, 1985). También se ha reportado una marcada pérdida o desintegración del acrosoma de los espermatozoides susceptibles al "choque por frío" (Hancock, 1957; Walton, 1957; Iype y cols., 1963). Es así que de la severidad del daño depende de la tasa de enfriamiento, el intervalo de temperatura y el rango de temperatura, estando generalmente entre los 2 a 12 °C (Watson, 1981).

Cuando los espermatozoides porcinos son eyaculados están especialmente propensos al daño por frío, perdiendo rápidamente su viabilidad al enfriamiento rápido a 0 °C (Watson, 1981; Watson y Plummer, 1985), sin embargo, se ha demostrado que la resistencia al frío se ve incrementada al hacer una pausa de 2 a 4 horas antes de disminuir la temperatura a menos de 15 °C (Watson, 1979; Pursel y cols., 1972, Pursel y Park, 1985). Así también Tamuli y Watson (1994) han demostrado que la resistencia de los espermatozoides porcinos al choque frío se incrementa al mantenerlos a la temperatura del laboratorio (22 °C) alrededor de 16h después de la eyaculación.

Se ha determinado que los espermatozoides testiculares y epididimarios de la cabeza y cuerpo del epidídimo, parecen ser más resistentes al choque frío que los espermatozoides de la cola del epidídimo y del eyaculado (Watson, 1995). La adición de la yema de huevo (YH) al diluyente modifica el efecto causado por el choque frío,

registrando un persistencia de la motilidad aún debajo de los 8-10°C y del batido flagelar hasta los 5-7 °C (y no a los 14 °C, como ocurre sin YH), sin evidencia del arqueado flagelar y hasta un 70% de los espermatozoides motiles al descongelado (Holt y cols. 1988).

La explicación del choque frío aún no es muy clara, pero se cree que está relacionada a la transición de fase de los lípidos de la membrana resultando en una separación de fase y pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas biológicas (Watson y Morris, 1987). En una revisión de Watson y Morris (1987), indican que existen muchos factores involucrados en la susceptibilidad de los espermatozoides porcinos al choque por frío, siendo los espermatozoides del epidídimo menos susceptibles al daño que los eyaculados; así mismo los espermatozoides en la totalidad del plasma seminal son más susceptibles que los de la fracción rica. Así también los espermatozoides de los primeros 10 ml de la fracción rica son más resistentes que del resto de la fracción rica, pudiendo evitarse el centrifugado en el protocolo (Saravia y cols., 2009b). Otro factor importante es la incubación de los espermatozoides post eyaculado, el cual incrementa su resistencia al choque frío, como ya se mencionó.

La composición de los ácidos grasos de la membrana plasmática juega un papel importante en la susceptibilidad al estrés térmico. Especies con una ratio de ácidos grasos poliinsaturados:saturados cercanos a la unidad son más resistentes, mientras que las membranas más susceptibles tienen ratios superiores a 2.5, como el porcino. Así también la tasa de colesterol:fosfolípido es un factor importante en la determinación de la fluidez de la membrana biológicas, así un elevado ratio determina una mayor resistencia de los espermatozoides al estrés térmico (Darin-Bennett and White, 1977).

Dentro del protocolo de congelación la fase de enfriamiento de 17 – 5 °C suele ser crítica como ya se indicó, pero no existen trabajos en porcinos que hayan determinado el uso de mayores velocidades de enfriamiento a las utilizadas en los protocolos actuales. En un trabajo realizado por Januskaukas y cols (1999) concluye que protocolos con bajas tasas de enfriamiento (0.10 °C/min) no son más benéficos de aquellos con altas tasas de enfriamiento (4.20 °C/min) en semen bovino, ya sea en parámetros de viabilidad espermática post descongelación, o para resultados de fertilidad post inseminación. Además concluye que los cambios parecidos a la capacitación están presentes en los

espermatozoides post descongelación, pero que son independientes a la tasa de enfriamiento utilizada. Así también similares datos se han registrado en especies silvestres como el ciervo rojo ibérico, utilizando en este caso espermatozoides de la cola del epididimo (Fernández-Santos y cols., 2006).

A pesar del daño producido en los espermatozoides debido al descenso de la temperatura, se ha observado que los espermatozoides de porcino pueden soportar temperaturas de hasta 12 °C por periodos prolongados (hasta 60 h) sin perder su capacidad fecundante y sin disminuir significativamente su motilidad (Althouse y cols., 1998).

2.5. Identificación de poblaciones espermáticas funcionales a la descongelación.

2.5.1. Motilidad espermática.

La evaluación de la motilidad y de la morfología de la célula espermática es un parámetro esencial en la evaluación de la calidad seminal y en el establecimiento de las correlaciones entre la calidad seminal y la fertilidad (Verstegen y cols., 2002). La motilidad, es necesaria para el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra, así como para la fecundación del ovocito. Además, es una expresión de la viabilidad e integridad estructural de la membrana espermática (Davis y Siemers, 1995). La motilidad de las muestras seminales puede ser evaluado en forma subjetiva u objetiva.

El análisis subjetivo de la motilidad es uno de los más utilizados para la evaluación de las muestras seminales debido a su sencillez. No obstante, su validez es limitada, pues existe una gran variabilidad en la estimación de los parámetros de motilidad de los mismos eyaculados, siendo la variabilidad mucho menor en los sistemas computarizados (Centola, 1996; Verstegen y cols., 2002). Cabe tener en cuenta también que el metabolismo del semen del verraco, anaeróticamente, convierte fructosa en ácido láctico a una tasa mucho más baja que los espermatozoides del carnero o del toro, y bajo estas condiciones su motilidad es también menor (Aalbers y cols., 1991).

Los sistemas de análisis automatizados o sistemas CASA, se iniciaron a desarrollar a finales de la década de los ´70 en humanos, el cual era un sistema semi automatizado consiguiendo una mayor precisión y objetividad que el sistema subjetivo tradicional

(Schmassmann y cols., 1979). Que en un principio no podían ser comparados entre los datos generados entre laboratorios ya que se necesitaban estandarizar los parámetros a usar (Knuth y cols., 1987). El sistema CASA Se basa en la digitalización de las imágenes espermáticas a partir de un campo microscópico, mediante la identificación de cabezas espermáticas en base a su tamaño, forma y luminosidad. Una vez identificadas, las posiciones sucesivas de las mismas permitirían el análisis de las trayectorias generadas. Los componentes comunes de los instrumentos CASA son una cámara de vídeo, una tarjeta capturadora de secuencia de vídeo, y una computadora. Los programas informáticos se utilizan para identificar y para seguir a todos los espermatozoides en las imágenes de vídeo y para realizar todos los cálculos de los datos (Boyers y cols. 1989).

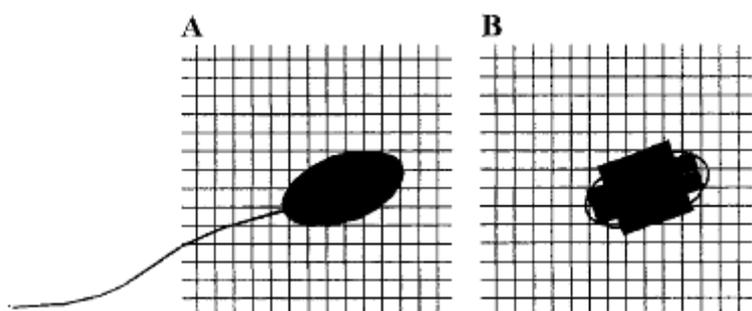


Figura 1. Digitalización de la imagen de la cabeza del espermatozoide. **(Panel A)**, la imagen de un espermatozoide con la elementos de la foto sobrepuestos (pixeles) que son usados para realizar el la imagen de video. **(Panel B)**, como "ve" la computadora la cabeza del espermatozoide después de la digitalización. Tomado de Mortimer (2000).

En sus inicios el desarrollo de la tecnología CASA, las mediciones objetivas de los mediciones cinéticas se basaban en estudios realizados en el movimiento del flagelo, esos movimientos cinéticos fueron subsecuentemente usados para describir la trayectoria de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide, primariamente como un método para la determinación de la función espermática. Pero la relación entre la cinemática del flagelo y de la cabeza no eran consistentes. Se publicaron muchos estudios en el cual el CASA fue usado inapropiadamente, haciendo difícil interpretar los resultados o comparar los estudios. Es así que Davis y Siemers (1995), indican que las mediciones cinéticas del movimiento del esperma puede dar información valiosa acerca de los mecanismos biológicos celulares (en el caso del flagelo) y acerca de la función general de la

membrana y del axonema (en el caso de la cabeza) cuando las mediciones se hacen bajo condiciones apropiadas, con técnicas estándar y fáciles de interpretar.

La creación del sistema CASA ha traído progreso en la evaluación de la motilidad del semen; por lo tanto, su uso es recomendable en laboratorios de investigación y estaciones de IA (Massanyi, 1989).

En todos los estudios que implican procedimientos CASA, los métodos tienen que ser descritos en forma completa y clara, particularmente en lo concerniente a la tasa de adquisición de la imagen, tiempo de muestreo de la secuencia, algoritmos, número de células muestreadas, tipo y profundidad de cámara usada, modelo y versión del programa usado, la óptica del microscopio y el aumento empleado. Debido a que no se ha conseguido su desarrollo, calibración y estandarización entre los diferentes equipos inventados (Verstegen y cols., 2002).

Para una correcta adquisición de datos en los sistemas CASA, se deben de tener en cuenta: la temperatura a la lectura, la cual debería estandarizarse y ser la más parecida posible a la temperatura corporal de la especie (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001), la profundidad de la cámara donde se coloca la muestra es importante, ya que puede limitar el movimiento del espermatozoide o tener alguna interacción con la pared de la cámara, además se recomienda una apropiada óptica (enfoque y medida) y correcta iluminación con la finalidad de lograr el mejor contraste (Kraemer y cols., 1998). La frecuencia de adquisición de las imágenes también es muy importante, ya que la reconstrucción de las trayectorias depende de la tasa de cuadros, así también varios parámetros cinéticos (Boyers y cols., 1989). Owen y Katz (1993) sugieren que 60 cuadros/s son convenientes para aplicaciones del CASA en el análisis de semen humano y otras especies de mamíferos. El número de campos analizados es importante, a mayor cantidad de campos analizados mayor número de células analizadas consecuentemente se reduce el coeficiente de variación y la precisión aumenta, recomendándose al menos 100 células por campo (Verstegen y cols., 2002). Se ha notado una fuerte influencia de la concentración espermática de la muestra en los resultados obtenidos, así la sobreestimación del conteo de espermatozoides mediante el CASA se ve influenciada por la concentración, una baja concentración podría dar lugar a mayor conteo de la suciedad presente, y una alta concentración dará lugar al cruce de las trayectorias, pudiendo originar trayectorias y velocidades confusas (Iguer-Ouada, y Verstegen, 2001).

2.5.1.1. Parámetros de Motilidad.

Las definiciones de las medidas cinéticas de los espermatozoides están basadas en las sucesivas posiciones del centroide de la cabeza espermática a través del tiempo. A partir de la geometría de las trayectorias se determinan velocidades y patrones de movimiento. Las principales medidas cinéticas determinadas por los sistemas CASA se definen a continuación (Blanco, 1998; Mortimer y cols., 2000).

2.5.1.2. Parámetros de Velocidad:

- ✿ Velocidad Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$): Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria real.
- ✿ Velocidad Rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de la línea recta que une la primera posición en el análisis y la última.
- ✿ Velocidad de la trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$): Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria media.
- ✿ Linealidad (LIN, %): Linealidad de la trayectoria curvilínea, ratio entre VSL y VCL.
- ✿ Rectitud (STR, %): Rectitud de la trayectoria media, ratio entre VSL y VAP.
- ✿ Oscilación (WOB, %): grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media, ratio entre VAP y VCL.

2.5.1.3. Parámetros de Angularidad:

- ✿ Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm): amplitud de las variaciones de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media.
- ✿ Dance (DNC, $\mu\text{m}^2/\text{s}$): $VCL \times ALH$.
- ✿ Dance medio o índice de hiperactividad, (DNM, μm): $DNC/VSL = ALH/LIN$
- ✿ Índice de Angularidad (AI, %) Valor porcentual de los ángulos menores formados por los segmentos que definen la trayectoria real o curvilínea.

2.5.1.4. Parámetros de Oscilación:

- ✿ Frecuencia de batido (BCF, Hz): Frecuencia con que la trayectoria real se cruza con la trayectoria media.

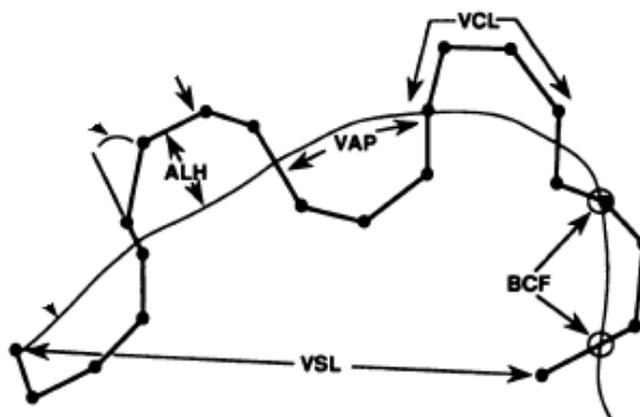


Figura 2. Representación esquemática de las muestras seminales mostrando parámetros cinéticos. Los puntos representan los puntos muestreados del CASA. ALH = Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; VSL = Velocidad rectilínea (o progresiva); VCL = Velocidad curvilínea, y VAP = Velocidad de la trayectoria media y BCF = Frecuencia de batido. Tomado de Owen y Katz (1993).

El registro de los diferentes parámetros cinéticos han posibilitado la determinación, mediante programas computacionales, como el Pattern Analysis Package (PATN; Belbin, 1993), aspectos no vistos en las investigaciones originales, dando así una mayor información sobre la cinética seminal durante el proceso de criopreservación y determinando que en el eyaculado de verraco existen diversos patrones de motilidad que se puede utilizar para definir las poblaciones espermáticas. (Abaigar y cols., 1999; Cremades y cols., 2005).

Abaigar y cols. (1999), identificaron 3 subpoblaciones espermáticas en el semen porcino, el Grupo 1: representaba a aquellos con movimientos altamente progresivos (alto VSL) y con una acción flagelar vigorosa (alto BCF); el grupo 2: representados por un tipo activo de movimiento (alto VCL) pero con un movimiento progresivo considerablemente reducido (bajo VCL y alto ALH) y el grupo 3: eran aquellos que representaban a células lentas y posiblemente degeneradas, en la cual todos los parámetros cinéticos eran menores a los otros grupos. De igual forma describió 4 subpoblaciones en el semen de gacelas.

Mientras Cremades y cols. (2005), determinaron 3 poblaciones en el eyaculado del verraco. La P1: las más numerosa, vigorosa (el más alto VCL y ALH y alto BCF) y/o de movimiento progresivo (alto VSL y VAP) de trayectorias rectilíneas o parabólicas; P2: con

movimientos menos vigorosos (bajo VCL y ALH) con una alta frecuencia de batido flagelar (el BCF más alto), pocos progresivos (bajo STR LIN) de trayectorias irregulares (el VCL mas alto que el VAP) y cubriendo distancias cortas (muy bajo VSL); el P3: de menor número de espermatozoides, incluyendo los espermatozoides con bajo batido de colas (bajo BCL) y bajo ALH, de trayectorias curvas (bajo VCL y muy bajo VAP) sin obvio movimiento progresivo (indetectable VSL, LIN y STR). Así mismo en la población P1 sometida a un nuevo análisis de patrones de movimiento, se determinaron 3 sub poblaciones: sP1, de rápido movimiento progresivo (alto VSL) en una línea bastante recta (alto LIN y STR), de movimiento regular y recto (su VAP siempre igual a su VCL); sP2, menos vigorosos (bajo VCL, ALH y BCF) pero similares al sP1, pero más lentos y el sP3, aquellos más vigorosos (alto VCL, ALH y BCF) pero menos progresivos (bajo VSL), de trayectoria irregular.

Así mismo Quintero-Moreno y Rodríguez (2003) determinó, mediante un análisis de agrupamiento de trayectorias espermáticas, la existencia de tres sub poblaciones espermáticas en semen porcino y cuatro en caballo y conejo coexistiendo en los eyaculados. Se encontraron diferencias significativas en la distribución de estas poblaciones, sobre todo en caballos y conejos, mientras en el cerdo una de esas subpoblaciones era la más representativa (89 %), caracterizada por una elevada motilidad progresiva y de trayectorias lineales, sin llegar a ser los más rápidos. Sin embargo no existió una relación clara entre las subpoblaciones espermáticas y la fertilidad "in vivo" del semen.

2.5.1.5. Factores que afectan la motilidad espermática.

La motilidad espermática se ve afectada por muchos factores durante el proceso de criopreservación. Dentro de ellos encontramos el descenso de temperatura, la osmolaridad del medio y los fenómenos de peroxidación lipídica.

La osmolaridad juega un papel importante en la motilidad espermática, es por eso que el uso de diluyentes hipertónicos (altas osmolaridades, 490 a 510 mOsm/kg), registran las mayores motilidades progresivas y generales post descongelado, lo cual puede deberse, al hecho de que los espermatozoide en estos diluyentes han perdido ya algo de su agua libre intracelular antes de congelar, que puede, a su vez, reducir la probabilidad de la formación de hielo intracelular (Zeng y cols., 2001).

Sin lugar a dudas la temperatura es uno de los factores más importantes que hace variar la motilidad espermática, así Holt y cols. (1988) observaron que al enfriar a 16°C espermatozoides de carnero, un 50% de las piezas intermedias del flagelo dibujaban un arco, y si la temperatura seguía descendiendo disminuía la motilidad progresiva de los espermatozoides perdiéndose todo el movimiento flagelar si se alcanzaba los 14°C. Pero en los espermatozoides porcinos esos efectos se ven disminuidos, ya que adquieren una cierta resistencia al choque por frío, cuando se incuban por varias horas a temperatura ambiente antes del enfriamiento (Pursel y cols., 1972).

Por otra parte, la aparición del fenómeno de peroxidación lipídica va a afectar también a la motilidad espermática, debido al daño oxidativo de una excesiva o inapropiada formación de ROS (De Lamarinde y Gagnon, 1992; Guthrie y Welch, 2006), pudiendo afectar también la capacidad para la fusión espermatozoide-oocito (Aitken y Clarkson, 1987). La reducción de la motilidad en los espermatozoides puede ser debido a una lesión inducida por las ROS sobre la utilización del ATP, por las mitocondrias, o una lesión en el aparato contráctil del flagelo (Guthrie y Welch, 2008).

Otro factor que afecta la motilidad y calidad espermática es lo referente al verraco usado, existiendo mucha variabilidad entre ellos (Kommisrud y cols., 2002).

Para una óptima medición de la motilidad espermática Fiser y cols. (1993) indican que con una tasa de enfriamiento de -30°C/min, un descongelado rápido de 1200°C/min sugiere ser lo más conveniente, logrando una aceptable tasa de supervivencia (> 50%).

2.5.2. Viabilidad espermática.

La evaluación de las membranas espermáticas es un indicador importante del éxito de la criopreservación ya que las membranas son extremadamente susceptibles al frío (Parks y Graham, 1992; Harrison, 1997; Holt y Medrano, 1997).

Buhr y cols. (1994) determinó que el proceso de criopreservación altera tanto el contenido lipídico de la membrana plasmática de la cabeza y las interacciones dinámicas de los lípidos de estas membranas, y que estos cambios podrían alterar directa o indirectamente los eventos que conlleven a una fertilización, y ser parcialmente responsable de las pérdidas de fertilización vistas con el semen porcino criopreservado.

El daño que provocan los procedimientos de criopreservación sobre los espermatozoides (Hammerstedt, 1990), van desde la hinchazón y la rotura de las membranas plasmática y acrosómica externa (Jones y Stewart, 1979) cambios en la fluidez de la membrana (Canvin y Buhr, 1989), el flujo irregular de Ca^{2+} intracelular (Robertson y cols., 1990) y cambios en la actividad enzimática (Holt y North, 1986).

Estas alteraciones relacionadas a la temperatura sobre la organización de los componentes estructurales de la membrana plasmática tienen efectos profundos sobre sus características, cambios asociados a la permeabilidad y capacidad de experimentar la fusión (Holt y North, 1986).

2.5.2.1. Evaluación de la viabilidad espermática.

El objetivo primario del análisis de semen es determinar el potencial de fertilización de la muestra seminal, siendo la evaluación de la motilidad espermática insuficiente, debido a su baja correlación con la fertilidad (revisión de Graham y Mocé, 2005). Es por ello que se hace necesario realizar otras evaluaciones, como la de determinar la viabilidad de la muestra seminal. La evaluación de la viabilidad del semen se basa en el uso de tinciones, que interactúan con la membrana intacta o dañada (Watson, 1990).

El análisis de la viabilidad se puede hacer usando colorantes observables en microscopia de campo claro, siendo la más usada la eosina-nigrosina (Hancock, 1951). La desventaja de esta es el hecho que ciertos espermatozoides se tiñen parcialmente, dificultando la interpretación de su *status* (Watson, 1990).

El uso de la microscopia de fluorescencia evitó este problema, existiendo una variada gama de fluorocromos, pudiendo usarse de manera combinada según su capacidad opuesta para atravesar la membrana plasmática, permitiendo la identificación, de población de espermatozoides vivos y muertos (Garner y Johnson, 1995). Sin embargo se debe evaluar un número elevado de células para reducir el error, lo que supone invertir un tiempo considerable, por eso la evaluación de la viabilidad espermática por citometría sería una alternativa mucho más ventajosa (Woelders, 1991).

El uso del citómetro de flujo en la evaluación de la calidad seminal permite que un mayor número de espermatozoides sean evaluados en poco tiempo (10 mil células en un inuto), dando la posibilidad de trabajar con poca muestra, aumentando la repetibilidad de

la prueba, evitando la subjetividad de la misma y permitiendo la evaluación simultánea con múltiples fluorocromos (Gillan y cols., 2005).

El citómetro de flujo permite la observación de características físicas, tales como el tamaño de la célula, forma y complejidad interna, y cualquier componente o función del espermatozoide que puede ser detectado por un fluorocromo o un compuesto fluorescente determinado.

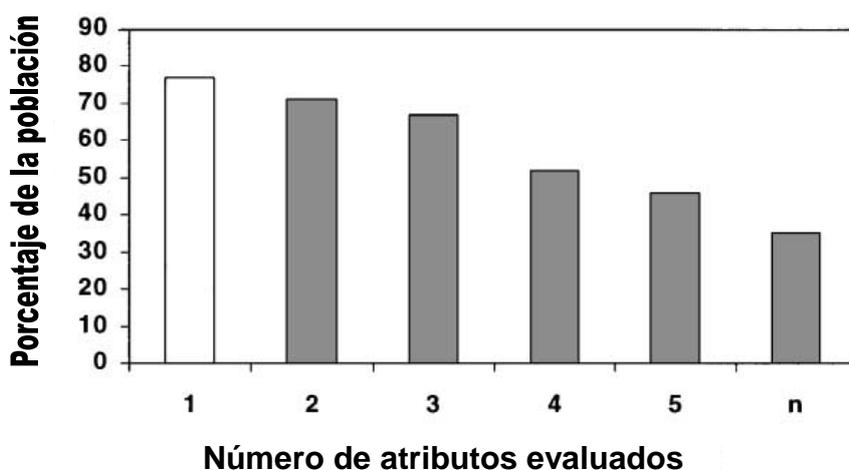


Figura 3. Subpoblaciones hipotéticas de espermatozoides en una muestra seminal considerada "fértil" cuando un atributo (1), dos (2), o un mayor número de atributos se miden simultáneamente. Cuando se mide un solo atributo (barra blanca) el porcentaje de espermatozoides "fértil" es sobrestimado. Adaptado de Amann y Hammerstedt (1993).

Los fluorocromos empleados para determinar la viabilidad de los espermatozoides pueden actuar de dos maneras: los fluorocromos que indican células viables y los que indican células no viables (Gillan y cols., 2005). En estos casos las células "viables" se define como las células que poseen una membrana plasmática intacta (revisión de Graham, 2001).

El uso de fluorocromos que tiñen células viables se ha desarrollado desde los años '80, Resli y cols (1983) usa el diacetato de fluroseina (FDA); otros usan el diacetato de 6-carboxifluroseina (CFDA) o el diacetato de 6-carboximetilfluroseina (CMFDA) (Garner y cols., 1986) y el ester de calceina acetometilada (CAM) (Donoghue y cols., 1995), siendo más estables que el FDA original. Estos fluorocromos entran al espermatozoide vía

membrana y son convertidos por las esterases, de las células viables, en un compuesto fluorescente no permeable el cual es retenido en el citoplasma. Otro grupo de fluorocromos usados para determinar la viabilidad, son los que tiñen el ADN y son permeables a la membrana, como el SYBR-14. La ventaja de este fluorocromo, es que al teñir el ADN, puede usarse en medios que contengan yema de huevo, sin necesidad de eliminarlo (Nagy y cols, 2003). Además se considera que el uso de fluorocromos que tiñen ADN son menos variables que las tinciones basadas en enzimas, ya que el ADN es un objetivo celular más apropiado debido a su tincionabilidad y uniformidad a la tinción (Garner y cols., 1994 y 1996; Garner y Johnson, 1995).

La determinación de las células no viables se puede determinar usando tinciones para ácidos nucleicos impermeables a la membrana, las cuales identifican positivamente los espermatozoides muertos, al penetrar en las células con la membrana dañada evitando la tinción de las células con la membrana intacta. Las tinciones más comúnmente usadas son las fenantridinas, como el Ioduro de Propidio (IP), ethidium homodimer-1 (EthD-1), la cianina Yo-Pro y el bizbenzimidazol Hoechst 33258 (Gillan y cols., 2005).

2.5.2.2. Evaluación de la integridad del acrosoma.

Para evaluar la integridad del acrosoma se utilizan muchos métodos pero el más común es la que usa lectinas de plantas etiquetadas con fluorocromos. La más común es la aglutinina del guisante (*Pisum sativum*) (PSA), que liga las mitades de la α -manosa y α -galactosa de la matriz acrosomal, así la PSA solo penetra al haber una membrana acrosomal reaccionada o daño en el espermatozoide. La aglutinina de mani (PNA) es una lectina que se une a las mitades de β -galactosa asociadas a la membrana acrosomal externa, haciendo que los espermatozoides con acrosoma dañado presenten fluorescencia (revisión de Graham, 2001; Gillan y cols., 2005). En la actualidad el uso de la PNA, es mas difundido, debido a que esta presenta menor especificidad a ligarse a otros sitios del espermatozoide que la PSA (Mortimer y cols., 1987). Las lectinas por si solas no presentan fluorescencia, sino que deben estar ligadas a un fluorocromo, siendo el más usado las ficoeritrinas (FITC).

El uso combinado de muchos fluorocromos permite la evaluación simultánea de muchas características de los espermatozoides, permitiendo la separación de las células en poblaciones con determinadas características. Además debe tenerse en cuenta que al seleccionar los fluorocromos a usar, estos deberían tener distintas longitudes de onda en la emisión de su fluorescencia (Nagy y cols. 2003).

2.5.3. Fluidez de la membrana y estado de capacitación.

La capacitación se define, en sentido amplio, como las modificaciones funcionales que hacen al espermatozoide competente para fertilizar un oocito. Los cambios funcionales debido a la capacitación incluyen la capacidad del espermatozoide a experimentar la reacción acrosómica requerida para liberar al espermatozoide de la pared del oviducto, para penetrar las sustancias mucosas dentro del oviducto y entre las células del cúmulo, y para penetrar la zona pelúcida del oocito (Ho y Suárez, 2001). Los mecanismos de la capacitación espermática están asociados a la membrana plasmática, produciéndose cambios en la localización, estructura molecular y movimiento lateral de las proteínas integrales (revisado por Medeiros y cols., 2002).

El colesterol es también un componente lipídico importante de la membrana plasmática del espermatozoide. Altos niveles de esteroides estabilizan las células espermáticas resultando en una mejor congelación. Esto se refleja en el éxito de la criopreservación de semen de diferentes mamíferos. Los espermatozoides humanos, caninos y bovinos contienen altos niveles de colesterol y se saben tener mejores propiedades crio-resistentes que especies con bajo niveles de colesterol como el esperma porcino y caprino (Parks y Lynch, 1992).

Un número de análisis funcionales han demostrado que el enfriamiento y la criopreservación, inducen en los espermatozoides de varias especies de mamíferos, un estado parecido a la capacitación, que es en parte responsable de la baja eficiencia a la fertilización de esos espermatozoides que sobrevivan a ese proceso (revisión de Bailey y cols., 2008). Esta capacitación inducida por la temperatura, no regulada es a veces llamada "criocapitación" (Cormier y cols., 1997).

Se especula que, las transiciones de fase y las modificaciones arquitectónicas experimentadas por las membranas del espermatozoide durante el enfriamiento y la

criopreservación están asociadas a una pérdida de colesterol, que inicia algunos de los acontecimientos intracelulares intrínsecos que llevan a un funcional, precozmente inadecuado, estado parecido a la capacitación (revisión de Bailey y cols., 2008). Actualmente, hay una gran evidencia que el proceso de criocapacitación no es equivalente a un estado de capacitación (Thomas y cols., 2006) y que bajo protocolos actuales que controlan el enfriamiento y el congelado-descongelado de los espermatozoides de semen porcino no induce a una capacitación espermática por sí mismo (Saravia y cols., 2007).

El estado de la capacitación en las células se ha determinado por cambios mediados por calcio, usando un antibiótico fluorescente, la clorotetraciclina (CTC). La CTC neutral e incomplejo atraviesa la membrana celular de los espermatozoides y entra en los compartimientos intracelulares que contienen calcio libre. Una vez dentro de los compartimientos, el CTC se carga negativamente y se une al calcio, haciéndose más fluorescente. El complejo CTC-calcio se liga preferentemente a las regiones hidrofóbicas, como el de la membrana celular, dando por resultado la coloración de patrones característicos de espermatozoides no-capacitados (F-), capacitados (B-) y acrosoma-reaccionados (patrón AR-) (revisión de Gillan y cols., 2005).

Un método alternativo para la determinación de la capacitación es con la tinción hidrofóbica merocianina 540 (M540). Se sabe que la M540 detecta una disminución en el ordenamiento de los fosfolípidos en la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Williamson y cols., 1983; Langer y Hui, 1993), la cual se cree que ocurre en espermatozoides capacitados (Rathi y cols., 2001).

Se ha detectado que la criopreservación causa la fragmentación del espermatozoide, la sobrecondensación del ADN espermático y la apoptosis espermática (Anzar y cols., 2002). Los cambios bioquímicos asociados a la apoptosis ocurren en la superficie de la célula y en el ADN. Al inicio de la apoptosis, una célula pierde la asimetría de su membrana. La fosfatidilserina (PS), normalmente presente en el interior del citoplasma, en la cara interna de la membrana plasmática de las células sanas, se desplaza y se expone en la cara externa de la membrana plasmática (Martin y cols., 1995). La exteriorización de la PS marca a las células apoptóticas para promover luego su fagocitosis por las células vecinas sanas (Anzar y cols., 2002). La incorporación de

técnicas que usan análogos marcadores de fosfolípidos y proteínas ligadoras, permitió investigar los cambios fosfolipídicos que ocurren en la membrana plasmática del espermatozoide. Una de las sustancias usadas es la Annexin-V, la cual es una proteína ligadora de fosfolípido dependiente de calcio, que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina (PS) y al estar conjugada a un fluorocromo, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), permite el reconocimiento de células con PS expuesto (Vermes y cols., 1995). Del mismo modo la Ro-09-0198 marcada puede ser usada para detectar la exposición en la superficie, de la membrana plasmática, la fosfatidiletanolamina (PE) (Silva y Gadella, 2006).

El uso de la Annexina V conjugada con FITC y el IP, permite la detección de células apoptóticas y necróticas distinguiéndolas de las células viables.

2.5.4. Peroxidación lipídica.

Se define como peroxidación lipídica como el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares, siendo este deterioro autocatalítico propagándose a lo largo de toda la bicapa lipídica y originando la pérdida progresiva de integridad y funcionalidad de las membranas (Jones y Stewart, 1979).

Las membranas son estructuras asimétricas en las que la bicapa lipídica, constituida de fosfolípidos, glicolípidos y esteroides (principalmente colesterol), presenta ácidos grasos en cadenas laterales. Esta bicapa es fluida debido a que las moléculas lipídicas pueden desplazarse libremente. Esta fluidez depende de la composición de ácidos grasos y de su contenido de colesterol. Cuanto más cortas sean y más dobles enlaces presenten las cadenas laterales mayor fluidez tendrá. El colesterol es capaz de disminuir dicha fluidez a la temperatura corporal y mantenerla a bajas temperaturas, además que puede aumentar la flexibilidad y estabilidad mecánica de la bicapa. Por lo tanto, cuando el colesterol está presente en altos niveles, como en los espermatozoides humanos y bovinos, proporciona propiedades crio resistentes a las células espermáticas. Mientras que los espermatozoides porcinos, se caracterizan por tener bajo nivel de colesterol, haciéndolos más susceptibles al proceso de criopreservación (Browsers y cols., 2005).

El primer paso del proceso de peroxidación, o iniciación, es la abstracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno reactivo (LH) de los lípidos. En la segunda etapa, o propagación, el proceso de abstracción deja un electrón no apareado en el átomo de C del grupo metilo, promoviendo el reordenamiento de los dobles enlaces adyacentes al grupo metilo y produciendo un radical lipídico alcoxilo, seguido de su rápida reacción con el oxígeno para formar radicales peróxilos (LOO^\cdot). Estos radicales son capaces de abstraer un átomo de hidrógeno de un ac. graso polinsaturado formando un nuevo radical lipídico e hidroxiperóxilos (LOOH). Los LOOH en presencia de iones de hierro pueden dar lugar a la formación de especies reactivas como los radicales LOO^* , alcoxilos o el epoxiperóxil. Estos pueden ser regenerados y el ciclo de propagación podría continuar indefinidamente o hasta que el substrato es totalmente consumido. Dichos radicales lipídicos son definidos como sustancias o compuestos oxígeno reactivos (ROS: reactive oxygen species) (revisión de Cheng y Li, 2007). Los ROS atacan a los espermatozoides originando la peroxidación lipídica, la cual conlleva a una pérdida de los ácidos grasos polinsaturados de las membranas espermáticas inhibición de la respiración, la pérdida de enzimas y la consecuente pérdida de la funcionalidad espermática (Saleh y Agarwal, 2002; White, 1993, Kumaresan y cols., 2008).

Todas las células producen, bajo condiciones aeróbicas, ROS, originadas mayormente por la actividad metabólica normal. Los procedimientos de congelación y descongelación induce daño en el espermatozoide e induce la producción de sustancias oxígeno reactivas en el esperma de mamíferos y el esperma del verraco parece ser más vulnerable que el esperma del toro (Brouwers y cols., 2005), alterando el contenido lipídico de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide así como las interacciones dinámicas entre los lípidos de estas membranas, aumentando su fluidez y sensibilidad al Ca^{+2} (Buhr y cols., 1994). Es por eso que parte de la reducción de la motilidad y fertilidad del semen asociada a la criopreservación puede deberse al daño oxidativo proveniente de la excesiva o inadecuada formación de ROS (Guthrie y Welch, 2006), existiendo una correlación altamente negativa entre los parámetros de calidad espermática y la producción de ROS (Vasco y cols., 2007).

El alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la membrana plasmática y un bajo nivel de antioxidantes en el citoplasma del espermatozoide los hace susceptibles al estrés oxidativo y al ataque peroxidativo durante la preservación (Aitken y

Clarkson, 1987, Cerolini y cols., 2000). Se ha visto que el proceso de criopreservación altera tanto la composición lipídica de la membrana plasmática así como las interacciones dinámicas entre los lípidos de esas membranas (Buhr y cols., 1994).

Se sabe que el estrés oxidativo es un factor importante en el bloqueo de la función espermática hace mas de 60 años (MacLeod, 1943 en Ball, 2008). Los efectos del estrés oxidativo son particularmente importantes durante el almacenado del semen ya sea por enfriamiento o criopreservación y este daño aumenta más en situaciones donde gran parte del plasma seminal se descarta de la muestra seminal porque mucha de la capacidad antioxidante en el semen reside en el plasma seminal.

El origen de las ROS en el semen es múltiple, siendo los espermatozoides dañados, inmóviles, morfológicamente anormales, leucocitos y espermatozoides morfológicamente normales pero funcionalmente anormales los que generan mayores cantidades de ROS que puedan contribuir a reducir la fertilidad o los problemas relacionados con la preservación del semen (Ball y cols., 2001; O'Flaherty y cols., 2006).

Las ROS más comunes implicadas en el daño oxidativo de los espermatozoides de verraco son el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Roca y cols., 2005; Guthrie y Welch, 2006). La célula espermática es capaz de producir O_2^- , el cual espontánea o enzimáticamente se convierte en H_2O_2 . Debido a su baja reactividad el O_2^- no es muy tóxico, aunque puede reaccionar químicamente con otros sustratos oxidativos y producir más radicales tóxicos (Brouwers y cols., 2005).

2.5.5. Detección de la peroxidación lipídica.

Como se ha visto la peroxidación lipídica genera la producción de sustancias ROS, es por eso que la determinación de los niveles de esta, nos indicaría la generación de un estrés oxidativo.

Actualmente se dispone de pruebas que, de manera directa o indirecta, determinan los niveles de ROS generadas en las muestras seminales. Dentro de la cuales destacamos las siguientes:

2.5.5.1. Medición de la producción de ROS mediante 2', 7'-diacetato de diclorhidrofluoresceína (H₂DCFDA).

La medición de la quimioluminiscencia de las ROS, como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es problemática debido a su pobre especificidad (Fridovich, 1997). La tinción no fluorescente, H₂DCFDA, es fácilmente permeable a través de la membrana, y se incorpora a las regiones hidrofóbicas de la membrana celular (Bass y cols., 1983), donde las esterasas dejan libre al 2', 7'-diclorhidrofluoresceína (H₂DCF), la misma que al ser oxidada por H_2O_2 , produce diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia a 530 nm en respuesta a 488 nm de excitación (Carter y cols., 1994).

2.5.5.2. Test del Acido Tiobarbiturico (TBA).

Por medio de este test es posible evaluar el daño oxidativo mediante la producción de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación lipídica. El procedimiento incluye la utilización del ácido tricloroacético, el mismo que precipita las proteínas celulares y permite posteriormente a través de la adición de ácido tiobarbitúrico (TBA), determinar la concentración de MDA utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm (Buege y Aust, 1978).

2.5.5.3. Uso de la quimioluminiscencia.

Este protocolo se basa en la utilización del Luminol, que es un sustrato oxidable extremadamente sensible, que tiene la capacidad de reaccionar con diversas ROS en un pH neutral. La reacción del luminol con las ROS da lugar a la producción de una ligera señal que es convertida en señal eléctrica (fotón) por un luminómetro (Kobayashi y cols., 2001). Los niveles de ROS evaluados midiendo la quimio-luminiscencia dependiente del luminol y son expresados como millones de fotones contados pro min por cada 20×10^6 espz (Saleh y Agarwal, 2002).

2.5.5.4. Capacidad Antioxidante Total (TAC).

La TAC se puede medir en el semen a través de un protocolo de quimioluminiscencia aumentada (Kolettis y cols., 1999). Consiste en el uso del plasma seminal, con luminol, para-iodofenol y peroxidasa de rábano (HRP). La HRP cataliza la reacción

entre un receptor (oxidante) y un donante de hidrógeno y , emisión clara ocurre cuando el sustrato de quimio-luminescencia (luminol) es oxidado por H_2O_2 en una reacción catalizada por HRP. Debido a que bajo condiciones normales esta reacción produce una emisión de baja intensidad, que puede decaer rápidamente, se utiliza para-iodofenol, el mismo ayuda a producir una emisión intensa, prolongada y estable, la cual depende de una constante producción de radicales libres (Saleh y Agarwal, 2002).

2.5.5.5. Evaluación de lipoperoxidación a través de C11-BODIPY^{581/591}

La tinción fluorescente C11-BODIPY^{581/591} es un análogo del ácido graso, que ha sido utilizada en la valoración de la peroxidación lipídica de células somáticas (Pap y cols., 1999) y células espermáticas en bovinos y porcinos (Brouwers y Gadella, 2003, Brouwers y cols., 2005). La C11-BODIPY^{581/591} es una sustancia lipofílica, que se incorpora fácilmente en las membranas celulares, la misma que parece no afectar negativamente la viabilidad espermática durante exposiciones prolongadas (12h) por lo que su evaluación es compatible con la evaluación del grado de peroxidación en espermatozoides vivos. Esta sustancia cambia de color de acuerdo a su estado, emite fluorescencia roja (591nm) cuando se intercala en la membrana celular, cambia su emisión a naranja (540nm) cuando es oxidado por peroxinitritos y a verde (520nm) cuando es oxidada por otros radicales de oxígeno (Drummen y cols., 2004). Esta propiedad permite la realización de valoraciones ratiométricas de la fluorescencia mediante citometría de flujo (Ball y Vo, 2002; Brouwers y Gadella, 2003), además de ser posible la observación directa mediante microscopia confocal. La limitación de la prueba consiste en que C11-BODIPY^{581/591} tiene limitada capacidad de discriminar entre los diferentes ROS y NOS (sustancias nitrógeno reactivas) *in vivo* (Drummen y cols., 2004).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. De los reactivos, diluyentes, medios y fluorocromos.

3.1.1.1. Reactivos.

Los reactivos empleados para la preparación de diluyentes y medios procedían de Sigma-Aldrich® Co (Sant Louis, Mo, USA), con alguna puntual excepción, en las que se hará referencia a la empresa fabricante. Todos los reactivos fueron pesados en una balanza de precisión (Gram Precision Serie ST Mod. ST-120, A.R.W.T.; Barcelona, España) y diluidos en agua bidestilada y purificada (Milli-Q, Millipore, Advantage. Elgastat UHQ ps, Elga; Bucks, Reino Unido). Las diluciones fueron homogenizadas con un agitador magnético dotado de calefactor (Mod. 234 P Agimatic, Selecta; Barcelona, España). Todos los diluyentes y medios se prepararon en un ambiente controlado (cámara de flujo laminar horizontal Micro-R, Telstar; Barcelona, España). El pH (Mod. GLP 22, Crison; Barcelona, España) y la osmolaridad (VAPRO, WESCOR, Mod. 3OM Plus, Advanced Instruments Inc.; MA, USA) fueron comprobados en cada diluyente y medio antes de su utilización. El pH fue ajustado, si procedía, con solución 0'1 N ó 1 N de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico.

3.1.1.2. Diluyentes seminales y espermáticos.

El diluyente *Beltville Thawing Solution* (BTS; Pursel y Johnson, 1975) fue el diluyente básico empleado para la dilución de los eyaculados (Tabla 1). Se empleó para el transporte de las fracciones ricas de los eyaculados desde los Centros de Inseminación Artificial (CIA) hasta el laboratorio de andrología del Hospital Clínico Veterinario, laboratorio donde se realizaron la criopreservación y las valoraciones de la calidad y funcionalidad espermática. También fue el diluyente de elección para la dilución preparatoria del semen fresco y de los espermatozoides congelados y descongelados para la valoración de la calidad y funcionalidad espermática. El diluyente, una vez preparado, se conservó a 5 °C durante un tiempo máximo de 15 d.

Tabla 1.- Composición del diluyente espermático Beltsville Thawing Solution (BTS).

Referencia	Componente	Concentración
G-6152	Glucosa	205 mM
S-4641	Citrato sódico	20'4 mM
23,652-7	Bicarbonato sódico	15 mM
ED2SS	EDTA ¹	3'6 mM
20,800-0	Cloruro potásico	10 mM
K-4000	Kanamicina	0'05 g/l

pH= 7'2-7'4; 295-330 mOsm/L

¹EDTA: ácido etilendiaminotetracético

El Diluyente *Tris-glucosa-ácido cítrico (TGC)*, cuya composición se recoge en la Tabla 2, fue el diluyente básico empleado para la congelación espermática. Al igual como ocurría con el BTS, el diluyente TGC, una vez preparado, se conservó a 5 °C durante un tiempo máximo de 15 d.

Tabla 2.- Composición del diluyente básico Tris-Glucosa-Ácido Cítrico (TGC).

Referencia	Componente	mM
T-1503	Trizma® base	111
G-6152	Glucosa	185
C-1990	Acido cítrico monohidratado	31'4

pH: 7'14

Osmolaridad: 310-320 mOsm/L

Trizma® base: tris(hidroximetil)aminometano

Los *diluyentes para la congelación espermática* fueron dos, el TGC suplementado con un 20 % de yema de huevo (TGC-y) y el TGC-y suplementado con un 3 y 0'5 % de concentración final de glicerol (empleado como crioprotector) y Equex STM (Nova Chemical Sales Inc, Scituate, Mass, USA), respectivamente, fue el diluyente de

congelación (TGC-yge). La composición de ambos diluyentes se recoge en la Tabla 3. Para la preparación de dichos diluyentes se utilizó yema procedente de huevos de gallina frescos. Para la preparación del diluyente TGC-y, la yema de huevo se añadió al diluyente TGC (80 %). Una vez correctamente mezclado, el diluyente se centrifugó a 4300 xg durante 30 min a 5 °C. Tras la centrifugación los tubos presentaron tres fases, descartando la fase superior y el pellet formado en la parte inferior del tubo. El medio TGC-y fue conservado a -20 °C hasta el momento de su uso. El diluyente TGC-yge fue preparado el mismo día de su utilización a partir de las muestras congeladas del diluyente TGC-y.

Tabla 3.- Composición de los diluyentes de congelación TGC-Yema (TGC-y) y TGC-Yema-Glicerol-Equex STM (TGC-yge).

Componente	TGC-y	TGC-yge
TGC (%)	80	
Yema de huevo (%)	20	
Kanamicina (µg/ml)	100	
TGC-y (%)	--	89'5
Glicerol (mL)	--	9'0
Equex STM ¹ (mL)	--	1'5
pH	6'0- 6'3	6'0- 6'3
Osmolaridad (mOsm/L)	320-330	1650-1750

¹Equex STM es equivalente a Orvus ES Paste (Graham y cols, 1971)

3.1.1.3. Medios para evaluar la funcionalidad espermática.

Para evaluar la funcionalidad espermática, los espermatozoides congelados-descongelados fueron incubados en un medio Tris-buffer modificado básico (TBMb, Abeydeera y Day, 1997) o suplementado con calcio, cafeína y albúmina sérica bovina (BSA) con el objetivo de inducir el proceso fisiológico de la capacitación espermática (TBMc, Caballero y cols., 2008). La composición de ambos medios se describe en la Tabla 4. El medio TBMb una vez preparado se conservó a 5 °C durante 15 días. Para

preparar el TBMc, al medio TBMb se le adicionó el cloruro cálcico, la cafeína y la BSA 2 h antes de su empleo. Previo a la incubación con los espermatozoides, los medios se mantuvieron en un incubador a 39 °C y 5 % de CO₂ durante 2 h.

Tabla 4: Composición del medio Tris-Buffer modificado básico (TBMb) y suplementado (TBMc).

Referencia	Componente	TBMb	TBMc
9888S	NaCL (mM)	131'1	131'1
P3911	KCl (mM)	3'0	3'0
G6152	Glucosa (mM)	11'0	11'0
P4562	Piruvato sódico (mM)	5'0	5'0
T1503	Trizma® base (mM)	20'0	20'0
P5530	Rojo fenol (ng/mL)	10-20	10-20
C7902	CaCl ₂ *2H ₂ O (mM)	--	7'5
C0750	Cafeína (mM)	--	1'0
A7888	BSA (mg/mL)	--	2'0
	Osmolaridad (mOsm/L)	290-310	290-310

Trizma® base: tris(hidroximetil)aminometano; BSA: albúmina sérica bovina.

3.1.1.4. Fluorocromos.

La *Triple tinción* fue el procedimiento para evaluar simultáneamente la integridad de las membranas plasmática y acrosomal externa. El procedimiento, descrito por Nagy y cols. (2003), comprende el uso de tres fluorocromos: **(1) SYBR-14**, que se utilizó el Kit de viabilidad LIVE/DEAD L-7011 (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, Holanda), del cual se preparó la solución stock del componente A; 100 µM de SYBR-14 en dimetil sulfóxido (DMSO) que luego se almacenó a -20 °C en alícuotas de 10 µL, previo a su uso se descongeló y diluyó 1:10 (v/v) en tampón fosfato salino (PBS) hasta lograr una concentración de 25 nM de SYBR-14. Es decir 10 µL de SYBR (stock) + 90 µL PBS. **(2) Ioduro de Propidio (IP)**: componente B del kit; de la solución inicial de 12mM de IP se preparó una solución stock de 1mg/ml en agua destilada, la cual fue conservada a -20 °C

hasta el momento de su utilización, momento en el que se rediluyó 1:1 (v/v) en PBS (1'5 mM de IP). Es decir 50 μ L IP + 50 μ L PBS. **(3) Lectina de *Arachis hypogea* conjugada con ficoeritrina (PE-PNA):** de la solución stock de PE-PNA (1 mg/ml, en un buffer compuesto de 3'0 M de sulfato de amonio, 50 mM fosfato sódico y 0'05 % ácido sódico, pH 7'0, y también conteniendo 1 mM de iones $[Ca^{2+}]$ y $[Mn^{2+}]$) (Phycoprobe R-PE-PNA, P44; Biomedica Corp, Foster City, California) se mantuvo en refrigeración a 5°C hasta el momento de su uso en el que se diluyó 1:10 (v/v) con PBS, llegando a obtener 2'5 μ g/mL de la solución PE-PNA. Es decir 10 μ L PE-PNA + 90 μ L PBS. Los tres fluorocromos fueron mezclados en alícuotas individuales que se conservaron a 4 °C hasta su uso.

La tinción de *Meriocianina 540 (M540)* y *Yo-Pro 1 (YP1)*, se empleó para evaluar la estabilidad de la membrana plasmática siguiendo una modificación del protocolo descrito por Harrison y cols., (1996). La M540 es una tinción hidrofóbica usada para monitorizar el desorden lipídico de la membrana celular, la cual nos indicaría cierta desestabilización de la membrana similar a la que ocurre durante el proceso de capacitación (Harrison, 1996), mientras que el YP1, siendo esta una carbocianina impermeable a la membrana que se liga al ADN, nos indica la viabilidad de la célula espermática. Primero se preparó una solución madre de M540 (M24571, Invitrogen, Molecular Probes, Willow Creek Road, Eugene - USA) mediante la dilución del contenido del vial (100 mg) en 1755 μ l de DMSO, solución que se almacenó en alícuotas de 5 μ L y se conservaron a -20 °C hasta su uso. La solución de trabajo se preparó añadiendo 500 μ L de DMSO a una alícuota, logrando una concentración 1 mM de M540. Esta solución de trabajo se podía conservar hasta 2 semanas a 4 °C. Para la tinción YP1 (Y3603, Invitrogen Molecular Probes, Willow Creek Road, Eugene - USA) se realizó una dilución 1:40 (vol/vol) de la solución madre en DMSO (5 μ L YP1 + 200 μ l de DMSO) para lograr una concentración de 25 μ M. La solución final se conservó a 4 °C durante una semana.

La tinción de *Annexin-V (AV)*, *AV Binding Buffer* y *IP* se utilizó para determinar el grado de apoptosis espermática. La AV es una proteína calcio dependiente que se liga a la fosfatidilserina (PS), la cual combinada con un fluorocromo, como FITC, nos permite identificar espermatozoides con exposición de PS, habiéndose comprobado que su exteriorización en células con membrana intacta es un indicio de muerte celular temprana (Peña y cols., 2003). Para ello se utilizó el conjugado ANNEXIN V-FITC (PHN1008,

Invitrogen, Camarillo, California - USA). Al ser la AV una proteína Ca^{++} dependiente, necesita la presencia de iones de calcio, lo cual se consigue cuando se diluye la AV en un tampón apropiado, el AV binding buffer (100 mM Hepes/NaOH pH7.5 más 1.4 M NaCl y 25 mM CaCl_2). La solución de trabajo de dicho tampón se prepara diluyendo en agua purificada 1:10 (vol/vol). Una vez diluido se procede a su uso o se puede conservar a -20°C hasta su uso. El IP (solución stock de 1 mg/ml) se utiliza para definir las poblaciones de espermatozoides con membrana plasmática alterada.

Para determinar la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS), se utilizó el procedimiento descrito por Guthrie y Welch (2006) que emplea el *fluorocromo* **CM-H₂DCFDA** [5-(y 6)-clorometil-2', 7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína, acetil ester]. El fluorocromo CM-H₂DCFDA (C6827, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene - USA), que es estable, permeable, penetra libremente a través de la membrana plasmática en los espermatozoides y se incorpora en las regiones hidrofóbicas de los mismos, no emite fluorescencia *per se*, pero una vez en el interior de la célula, las esterasas rompen su molécula dejando libre la 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), la cual es oxidada por las sustancias ROS, produciendo diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia a 530 nm en respuesta a 488 nm de excitación (Carter y cols, 1994). La solución stock de CM-H₂DCFDA (50 µg) de 1 mM fue preparada en DMSO (86'53 µL) y conservada a -20°C hasta el momento de su utilización. Para estimular la producción de ROS por parte de los espermatozoides, se utilizó un peróxido lipídico análogo, denominado *tert*-butil hidroperóxido (en 70 % agua, C₄H₁₀O₂, B2633, Sigma Aldrich, St. Louis, MO - USA). El TBHP provocará en los espermatozoides, en mayor o menor medida dependiendo del grado de sensibilidad de los mismos, la producción interna de ROS. A partir de la solución madre de 7'3 M de TBHP, se preparó con agua bidestilada y purificada la solución stock de 1 M. Esta se preparaba diariamente justo antes de cada experimento. La solución inductora final fue de **1mM** (1 µL de TBHP 1 M en 1000 µL de muestra diluida).

3.1.2. De los verracos y eyaculados.

3.1.2.1. Verracos.

Los eyaculados procedían de verracos adultos, con edades comprendidas entre 2 y 4 años, y de fertilidad contrastada, ya que todos ellos estaban sometidos a programas de

inseminación artificial con un ritmo de eyaculación de un salto cada 3-4 días. Los verracos, todos ellos híbridos comerciales, se encontraban ubicados en los centros de inseminación artificial que las empresas AIM Ibérica y ZASEPORC tienen en Calasparra (Murcia) y Coreses (Zamora), respectivamente. En ambos centros, los verracos estaban alojados en parques individuales ubicados en el interior de naves con temperatura controlada de unos 20-22°C. Las naves estaban expuestas a la luz natural, la cual se suplementaba con luz eléctrica hasta conseguir un régimen luminoso de 16 h/día. Los verracos tenían libre acceso al agua y estaban alimentados con una dieta comercial que cubría los requerimientos nutricionales propios de verracos adultos sometidos a programas de inseminación artificial.

3.1.2.2. Eyaculados.

De cada eyaculado se recogió la fracción rica en un termo atemperado a 37°C, mediante el método de la mano enguantada. Dicha fracción fue, inmediatamente después de la recogida, diluida en BTS (1:1, vol/vol). A continuación se procedió a evaluar la cantidad y calidad seminal, empleando para ello los procedimientos estándar que se siguen en los laboratorios de inseminación artificial (Martín-Rillo y cols., 1996). Se seleccionaron para la criopreservación los eyaculados con al menos 200×10^6 espz/mL y con unos porcentajes mínimos del 70 y 80% de espermatozoides motiles y viables, respectivamente. Los eyaculados seleccionados se conservaron a 17°C y, a esta temperatura, fueron transportados al laboratorio de Andrología de la Universidad de Murcia, donde permanecieron a 17°C hasta completar las 18 - 20 h post eyaculación y proceder a su procesado para la criopreservación.

3.2.- Métodos.

3.2.1. Criopreservación espermática.

Los espermatozoides se criopreservaron siguiendo una modificación del protocolo descrito por Hernández y cols. (2007b). La fracción rica del eyaculado, diluida 1:1 (vol/vol) en BTS y conservada a 17 °C fue centrifugada a 2400 xg durante 3 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Sepatech GmbH - Germany), eliminándose el sobrenadante, para posteriormente diluir el pellet espermático en medio TGC-y hasta una concentración de

1.5×10^9 espz/mL. Después de su enfriamiento hasta 5°C (a diferentes velocidades tal y como se muestra en el diseño experimental), el pellet diluido en TGC-y fue re-diluido en TGC-yge hasta una concentración final de 1×10^9 espz/mL (con una concentración final de glicerol y Equex Stem de 3 y 0.5%, respectivamente). Posteriormente, los espermatozoides así diluidos fueron envasados en una envasadora automatizada MPP Uno (Minitub, Tiefenbach, Germany) en pajuelas de PVC de 0.5 mL (Minitub, Tiefenbach, Germany) las cuales una vez colocadas en racks, fueron depositadas en la cámara de un biocongelador horizontal (IceCube 1810; Minitub), siendo congeladas hasta -150°C en tres etapas, la primera desde $+5^{\circ}\text{C}$ hasta -5°C a $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, la segunda desde -5°C a -80°C a $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y tras un periodo de 30 s -80°C , la tercera desde -80°C hasta -150°C a una velocidad de $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -150°C . Inmediatamente después, las pajuelas fueron retiradas de la cámara del biocongelador y depositadas en el interior de tanques de nitrógeno líquido donde se conservaron a -196°C .

Las pajuelas permanecieron en el tanque de nitrógeno líquido por al menos 4 d antes de proceder a su descongelación, la cual se realizó depositando las pajuelas, de manera individualizada, en baño de agua circulante a 37°C donde fueron sumergidas y enérgicamente agitadas durante 20 s. Posteriormente, se retiraron del baño, se secaron y su contenido fue diluido en BTS (1:1 vol/vol). Dicha dilución fue depositada en una cámara oscura a 37°C , donde permaneció hasta el momento de realizarse las valoraciones de calidad y funcionalidad espermática.

3.2.2. Procedimientos para determinar la calidad espermática.

3.2.2.1. Concentración espermática y porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

Para la determinación de la concentración y morfología espermática, las muestras seminales fueron diluidas 1:100 (vol/vol) en una solución salina al 0.9 % de cloruro sódico (S-9888) suplementada con 0.3 % (v/v) de formaldehído al 37 % (F-1635). La concentración espermática se determinó mediante el procedimiento de la cámara de contaje celular (cámara de Bürker) y la morfología espermática mediante microscopía de contraste de fases (objetivo de 40x). De cada muestra seminal se evaluó la morfología a un total de 200 espermatozoides clasificándolos en dos categorías: con morfología normal

o anormal. Dentro de este segundo grupo se agruparon tanto los defectos de la cabeza, como los del tracto intermedio y cola espermática, incluyendo también las gotas citoplásmicas proximales. Los resultados se expresan como el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

3.2.2.2. Motilidad espermática y cinética de movimiento.

Las evaluaciones de motilidad fueron realizadas objetivamente mediante un sistema de análisis espermático computarizado (CASA) (ISAS[®], Proiser, Valencia, España) y utilizando un microscopio de contraste de fases (Labophot, Nikon; Tokio – Japón). La captura de las imágenes se realizó con una cámara de video (Basler Vison Technologies A 312f, Alemania), operando a 25 imágenes por segundo (25Hz). Cada secuencia individual de esperma fue identificada dentro de 25 imágenes de video secuencial (correspondiendo a 1'0 segundos de movimiento). El radio de búsqueda fue 11'49 mm, y los espermatozoides con una velocidad media menor a 10 $\mu\text{m/s}$ fueron considerados inmóviles. Según el protocolo descrito por Cremades y cols. (2005), el semen descongelado y diluido en BTS fue nuevamente diluido en BTS para lograr una concentración de 25 a 30 x 10⁶ espermatozoides/mL. Para cada evaluación se utilizó 5 μL de muestra puestos en una cámara de conteo de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente calentada a 39°C en una placa térmica (HT400, Minitüb; Tiefenbach, Alemania).

Para cada muestra de semen, se analizaron un mínimo de 6 campos con al menos 100 espermatozoides por campo. Antes del análisis de los campos, se procedió a identificar y registrar la trayectoria de cada espermatozoide con la finalidad de eliminar falsas capturas (detritos) y disminuir el riesgo de trayectorias confusas. Se registraron los siguientes parámetros de motilidad y de la cinética del movimiento espermático:

Parámetro de Motilidad:

- a. *Porcentaje total de espermatozoides móviles* (TEM, %), que se define como el número de espermatozoides con una VAP (velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria media) superior a 20 $\mu\text{m/s}$ x 100/ número total de espermatozoides evaluados.

Parámetros de la cinética del movimiento espermático:

- a. *Velocidad curvilínea* (VCL, $\mu\text{m/s}$): velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria real.
- b. *Velocidad rectilínea* (VSL, $\mu\text{m/s}$): velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de la línea recta que une los puntos de partida y final de la secuencia.
- c. *Linealidad* (LIN, %): grado de disposición lineal de la trayectoria curvilínea ($\text{VSL/VCL} \times 100$).
- d. *Rectitud* (STR, %), como de curvilínea es la trayectoria media ($\text{VSL/VAP} \times 100$).
- e. *Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza* (ALH, μm), amplitud de las variaciones de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media.

Estos parámetros de la cinética del movimiento, obtenidos de cada uno de los espermatozoides móviles evaluados, fueron utilizados para definir dos subpoblaciones espermáticas. La primera, denominada subpoblación de **espermatozoides con movimiento rápido y progresivo**, estaba compuesta por los espermatozoides que mostraban una alta VSL ($\geq 40 \mu\text{m/s}$), LIN ($\geq 50 \%$) y STR ($\geq 75 \%$). La segunda, denominada subpoblación de **espermatozoides hiper móviles**, reunía, siguiendo el criterio establecido por Schmidt y Kamp (2004), a todos los espermatozoides con alta VCL ($\geq 97 \mu\text{m/s}$) y ALH ($\geq 3.5 \mu\text{m/s}$) y baja LIN ($\leq 35 \%$).

3.2.2.3. Viabilidad espermática.

La viabilidad espermática se definió como el porcentaje de espermatozoides que mostraban integridad de las membranas plasmática y acrosomal externa. Dicha integridad fue evaluada simultáneamente usando el procedimiento de triple tinción descrito por Hernández y cols., (2007b), consistente en la tinción de los espermatozoides por tres fluorocromos, SYBR-14, IP y PE-PNA, y la posterior lectura de la fluorescencia mediante citometría de flujo (Coulter Epics XLTM, Coulter Corp, Miami, Fla, USA). Para ello se tomaron alícuotas de semen de $100 \mu\text{L}$ (con unos 3×10^6 espermatozoides) a las que se añadieron $15 \mu\text{L}$ de la triple tinción descrita anteriormente. Las muestras fueron mezcladas e incubadas en oscuridad a 37°C durante 10 min. Justo antes del análisis, a cada alícuota se le añadió $400 \mu\text{L}$ de PBS, y tras una ligera agitación, se procedió a su lectura por citometría. La muestra espermática fue excitada por un laser de 488 nm de ion

Argón. La fluorescencia SYBR-14 (partículas conteniendo ADN, espermatozoides con membrana plasmática íntegra) fue detectada con un filtro de pase de bandas (BP) de 525 nm, la señal de IP (espermatozoides con pérdida de integridad de la membrana plasmática) fue detectada por un filtro de BP de 620 nm y la fluorescencia de PE-PNA (células con pérdida de integridad en la membrana acrosomal externa) fue detectada usando un filtro de BP de 575 nm. El registro y análisis se realizó usando el software Expo32 ADC Analysis 1.1C (Beckman Coulter Inc., Miami, Fla, USA). Las subpoblaciones espermáticas fueron subdivididas en cuadrantes, y fue cuantificada la frecuencia de cada una de ellas. El registro de datos se detuvo luego de haber registrado 5.000 eventos, a una velocidad de registro de 800 espz/s.

3.2.3. Procedimientos para determinar la funcionalidad espermática

3.2.3.1. Desestabilización de la membrana plasmática.

Para evaluar el grado de desestabilización de la membrana plasmática se utilizó la doble tinción fluorescente compuesta por la M540 (que identifica el desorden lipídico) y el YP1 (que identifica los espermatozoides no viables). Para ello, a muestras de semen diluidas en TBMb o TBMc hasta 30×10^6 espz/mL (950 μ L de medio + 50 μ L de la muestra seminal) se les añadió 1 μ L de YP1 (25 nM en DMSO), y tras su incubación a 37°C durante 8 min en lugar oscuro, 2'6 μ L de M540 (1 mM en DMSO). Tras una nueva incubación de 2 min, se procedió a su lectura por citometría. Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides viables (negativos a IP) con membrana plasmática inestable o desestabilizada (positivos a M540). La fluorescencia emitida por M540 fue detectada con un filtro de pase de bandas (BP) de 620 nm y la señal de YP1 fue detectada por un filtro de BP de 525 nm. Las subpoblaciones espermáticas fueron subdivididas en tres cuadrantes, en los que se recogían los espermatozoides viables (YP1 negativo) y con membrana plasmática estable (M540 negativo), viables (YP1 negativo) y con membrana plasmática inestable o desestabilizada (M540 positivo) y, por último, espermatozoides no viables (YP1 positivo). En los resultados se presenta únicamente la población de espermatozoides viables y con membrana plasmática inestable o desestabilizada.

3.2.3.2. Apoptosis celular.

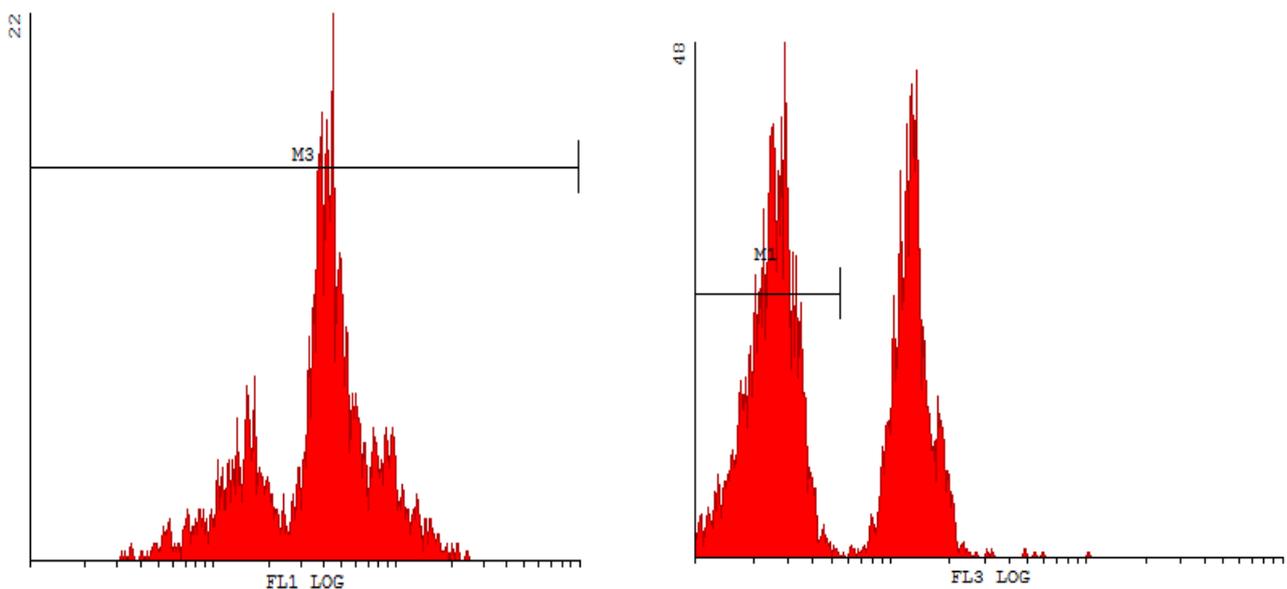
Para evaluar la exteriorización de la PS en la membrana espermática que nos indicaría el inicio de un proceso apoptótico o de muerte celular temprana en una determinada población espermática, se utilizó la doble tinción basada en los fluorocromos IP y Annexin V-FITC. Para cada medio (TBMb y TBMc) se prepararon 3 muestras consistentes en 70 μL del tampón más 30 μL de la muestra seminal (30×10^6 espz/mL). A dos de las muestras de cada medio se les añadió 2.5 μL de IP (1 mg/ml), y a una de ellas 3 μL de AV. Todas las muestras se incubaron en cámara oscura a temperatura ambiente ($\approx 23^\circ\text{C}$) durante 15 min, posteriormente se les añadieron 400 μL de tampón e inmediatamente se procedió a su lectura por citometría. Las tinciones fueron excitadas por un laser de 488 nm de ion Argón. La señal de AV (células apoptóticas) fue detectada por un filtro de BP de 525 nm y la señal de IP (células no viables) fue detectada con un filtro de BP de 620 nm. La muestra sin fluorocromos fue utilizada para establecer el cuadrante donde se situaba la población espermática. La segunda muestra, la que incorporaba IP únicamente, se utilizó para identificar las poblaciones de espermatozoides viables (IP negativas) y no viables (IP positivas). A partir de los resultados de estas muestras, se podía en la tercera muestra, la que incorporaba AV e IP, identificar cuatro subpoblaciones espermáticas, la que recogía a los espermatozoides viables (IP negativa) y sin apoptosis (AV negativa), viables (IP negativa) y con apoptosis (AV positiva), no viables (IP positiva) y con apoptosis (AV positiva) y, por último, no viables (IP positiva) y sin apoptosis (AV negativa). En los resultados se presenta únicamente la población de espermatozoides viables y con apoptosis.

3.2.3.3. Determinación de la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS).

La producción intracelular de ROS en los espermatozoides vivos tras el proceso de congelación-descongelación fue determinada mediante la utilización combinada de los fluorocromos CM-H₂DCFDA e IP, y cuantificada por citometría de flujo siguiendo una modificación del método descrito por Guthrie y Welch (2006). A partir de una muestra seminal de 30×10^6 espz/mL, se prepararon tres sub-muestras de 1 mL (950 μL de medio + 50 μL de la muestra seminal) para cada uno de los dos medio (TBMb y TBMc). A dos de las sub-muestras de cada medio, se le adicionaron 5 μL de la solución de IP (1 mg/mL) y

1 μL de la solución CM-H₂DCFDA y se incubaron a 39 °C con 5 % de CO₂ durante 30 min. Asimismo, a una de estas dos sub-muestras se le adicionó, también previo a la incubación, 1 μL de la solución de TBHP con el objetivo de inducir la generación intracelular de ROS. A la cantidad final de ROS producida en cada una de las dos sub-muestras ya mencionadas se le restaron los niveles de ROS detectados en la tercera sub muestra, a la que solamente se le adicionaron 5 μL de la solución de IP antes de la incubación (control). Las tinciones fueron excitadas con un laser de argón de 488 nm. La fluorescencia verde de CM-H₂DCFDA, fue identificada con un filtro 525 nm y la roja del IP con uno de 620nm. La intensidad de fluorescencia de DCF (M3, Figura a) fue expresada como unidades de fluorescencia $\times 10^{12}$ espermatozoides vivos (UF en 10^{12} espz, ver fórmula). Adicionalmente, el porcentaje de células vivas (IP negativo) fue determinada (M1, Figura 4).

Millones de espz vivos =



3.2.3.4. Volumen celular medio.

Para determinar el volumen celular medio (VCM, μm^3) se utilizó la tinción de yoduro de propidio (IP). A muestras seminales de 20 μL (con una concentración de entre 0'25 a 2×10^6 espz/mL) se les añadió 2'5 μL de IP (1 mg/mL) y 480 μL de BTS. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 5 min en una cámara oscura. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, empleando para ello el citómetro de flujo Cell Lab Quanta™ SC (Beckman Dickinson, Miami, FL - USA). La tinción fue excitada por un laser de ion Argón de 488 nm. La señal de IP (espermatozoides con pérdida de integridad de la membrana plasmática) fue detectada por un filtro de BP de 620 nm. El registro y análisis se realizó usando el software Cell Lab Quanta™ SC. Los resultados se expresaron para espermatozoides viables (IP negativos) y no viables (IP positivos). El registro de datos se detuvo tras registrarse 2.000 eventos y el número de eventos osciló entre 10 y 100 por segundo, siendo la velocidad de trabajo lenta y constante (4'17 $\mu\text{L}/\text{min}$). Al inicio de cada análisis el equipo fue calibrado mediante el empleo de esferas fluorescentes de diámetro y volumen conocido (Flow-Check™ Fluorospheres/Flow-Check, Beckman Coulter). Al no observarse diferencias de VCM entre los espermatozoides viables y no viables, en los resultados se expresa el VCM medio de toda la población espermática.

3.3. Diseño experimental.

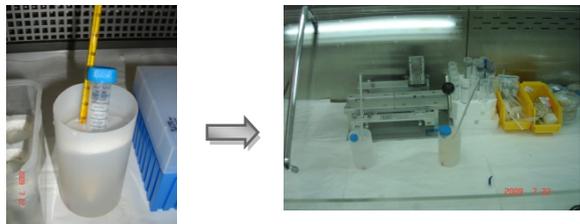
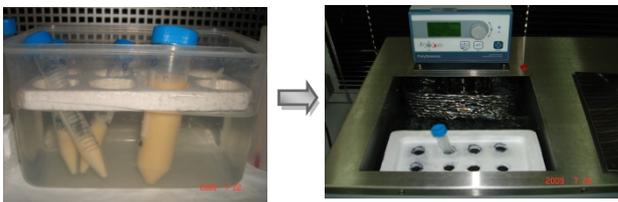
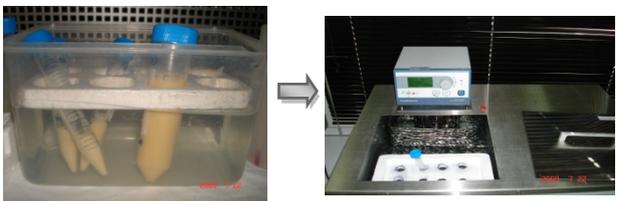
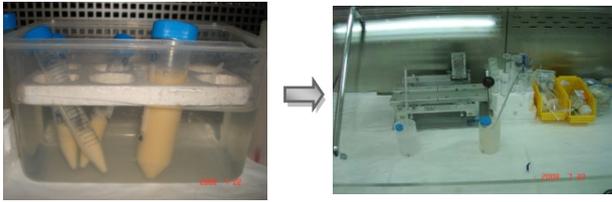
El objetivo del presente estudio fue evaluar cómo diferentes velocidades de enfriamiento de las muestras seminales entre los 17 y 5 °C influyen en la calidad y funcionalidad de los espermatozoides de porcino sometidos al proceso de congelación-descongelación. Las velocidades de enfriamiento evaluadas fueron 4 (Tabla 5). Una de ellas, como control, fue la habitual en los protocolos de criopreservación que se emplean para espermatozoides de porcino: 0'08 °C/min. Para conseguir dicha velocidad en el descenso de temperatura, las muestras seminales se colocaron en un baño de agua a 17 °C colocado en el interior de una cámara a 5°C (Figura 5). Las restantes 3 velocidades fueron todas ellas más rápidas que la anterior. En dos de ellas, las de 0'13 y 0'40 °C/min, el descenso de temperatura se llevo a cabo en un equipo de baño circulante con refrigeración/calor (Serie 9600, PolyScience, Preston Industries, Niles, Illinois - USA). El baño utiliza una solución compuesta por 30% de Etilenglicol y 70% de agua, donde se

sumergen los tubos con las muestras seminales (Figura 6 y 7). Por último, la cuarta velocidad, la que supuso el descenso más rápido de temperatura (1'50 °C/min), se consiguió depositando las muestras seminales en un baño de agua a 5 °C colocado en el interior de una cámara también a 5°C (Figura 8). De manera aleatoria se realizaron controles con termómetro de lectura digital (Termocupla HI93531, Hanna Instruments Srl., Ronchi di Villafranca (PD) - Italy) para asegurar que las diferentes velocidades de enfriamiento se cumplieran (Figura 9).

La calidad espermática se evaluó inmediatamente después de recepcionar en el laboratorio las fracciones ricas de los eyaculados diluidas 1:1 (vol/vol) en BTS. Posteriormente, se evaluó de nuevo una vez las muestras seminales alcanzaron los 5 °C. Finalmente, en las muestras descongeladas se realizaron dos nuevas evaluaciones de la calidad espermática, a los 30 y 150 min de su incubación en cámara oscura a 37°C.

La funcionalidad espermática se evaluó en las muestras seminales congeladas y descongeladas tras 30 y 150 min de incubación en cámara oscura. Para evaluar la funcionalidad, cada muestra seminal fue dividida en dos fracciones inmediatamente después de su descongelación. Una de las fracciones, la considerada como control, fue diluida en el medio TBMB e incubada a 37 °C. La segunda, considerada testigo, fue diluida en el medio TBMC, medio considerado capacitante, e incubada a 39 °C y bajo una atmósfera de 5% de CO₂. La funcionalidad espermática fue evaluada a los 30 y 150 min post-descongelación.

Tabla 5: Procedimiento empleado en las cuatro velocidades de enfriamiento evaluadas.

Velocidad	Procedimiento	Figuras
- 0'08 °C/min (control)	La muestra de semen (en tubo de 15 mL) colocada en una cubeta con agua a 17 °C dentro de una cámara fría (17 °C), se trasladaron a otra cámara fría a 5°C, para lograr el descenso de temperatura en 150 min aprox.	 <p>Figura 5: Muestra en cubeta con agua a 17 °C, colocada en cámara fría a 5 °C, velocidad de enfriamiento 0'08 °C/min.</p>
- 0'13 °C/min	La muestra de semen (en tubo de 15 mL) colocada en una cubeta con agua a 17 °C dentro de una cámara fría (17 °C), se trasladó a un equipo de baño circulante, programado para un descenso de temperatura controlado de 17 °C a 5 °C en 90 min.	 <p>Figura 6: Muestra en cubeta con agua a 17 °C, colocada luego en un equipo de baño circulante con descenso programado de temperatura a 5 °C por 90 min, velocidad de enfriamiento 0'13 °C/min.</p>
- 0'40 °C/min	La muestra de semen (en tubo de 15 mL) colocada en una cubeta con agua a 17 °C dentro de una cámara fría (17 °C), se trasladó a un equipo de baño circulante, programado para un descenso de temperatura controlado de 17 °C a 5 °C en 30 min.	 <p>Figura 7: Muestra en cubeta con agua a 17 °C, colocada luego en un equipo de baño circulante con descenso programado de temperatura a 5 °C por 30 min, velocidad de enfriamiento 0'40 °C/min.</p>
- 1'50 °C/min	La muestra de semen (en tubo de 15 mL) colocada en una cubeta con agua a 17 °C dentro de una cámara fría (17 °C), se trasladó a otra cubeta con agua a 5 °C en otra cámara fría a 5°C, para lograr el descenso de temperatura en 8 min aprox.	 <p>Figura 8: Muestra en cubeta con agua a 17 °C, colocada en otra cubeta a 5 °C en cámara fría a 5 °C, velocidad de enfriamiento 1'50 °C/min.</p>

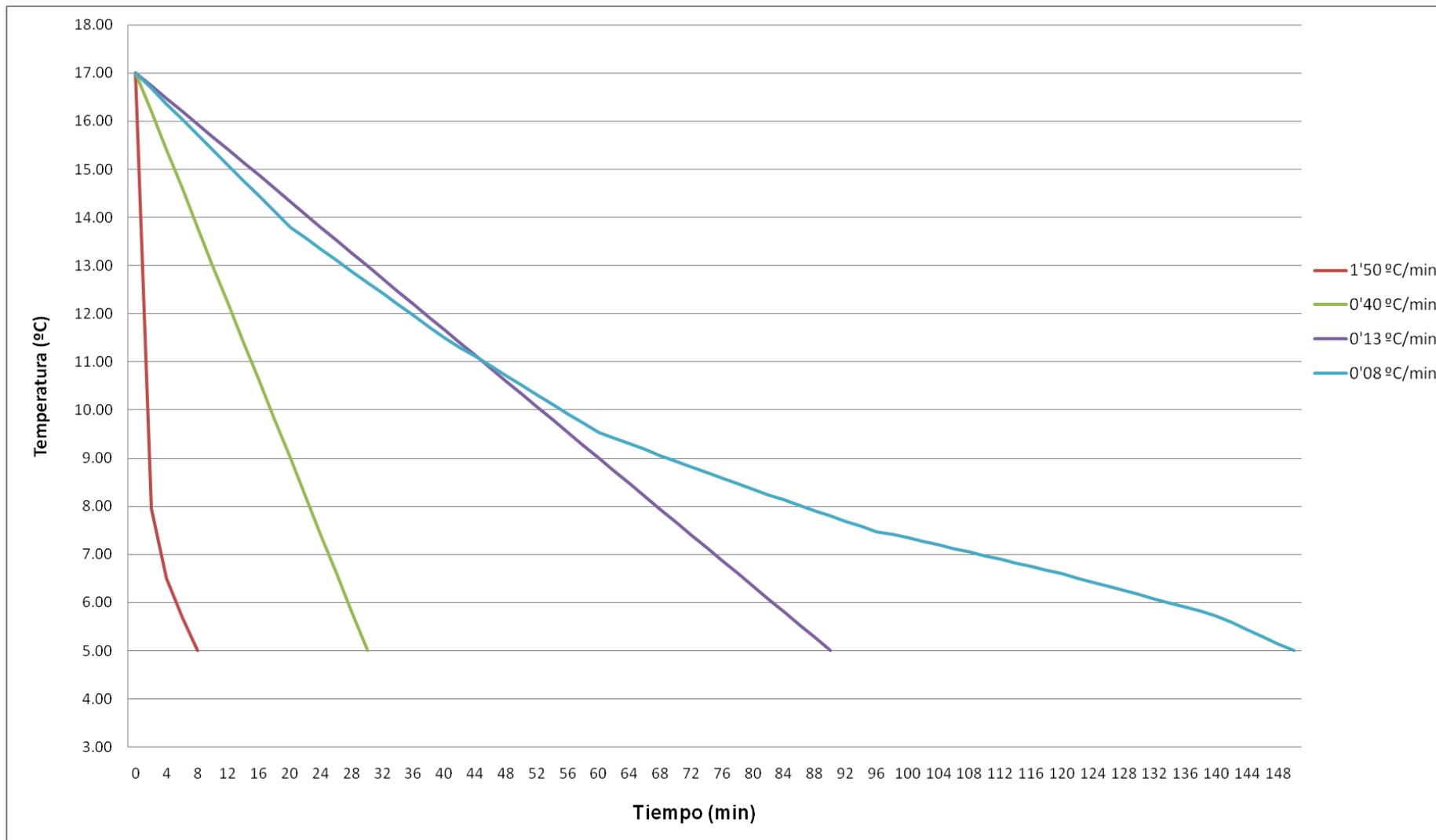


Figura 9: Curva de descenso de temperaturas de los diversos tratamientos empleados.

3.4.- Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en las diferentes pruebas analíticas fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS-15, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Las diferencias entre los pools de semen (A y B) en las características del semen fresco y en los valores medios de las variables de la cinética del movimiento espermático que definen la población de espermatozoides móviles así como cada una de las dos subpoblaciones espermáticas del experimento 1 (VSL, STR y LIN para la de espermatozoides rápidos y progresivos, y VCL, LIN y ALH para la de espermatozoides hipermóviles), fueron evaluados mediante un ANOVA de una vía, siendo el pool de semen la variable independiente.

Para evaluar posibles diferencias en los parámetros de calidad espermática a lo largo del proceso de congelación-descongelación del experimento 1, se realizó un ANOVA mixto en el que el pool de semen (A y B), la velocidad de enfriamiento (0'08, 0'13, 0'4 y 1'5 °C/min) y las etapas del proceso de congelación descongelación (a 5 °C y post-descongelación a los 30 y 150 min de incubación a 37 °C) fueron los factores fijos, siendo los ensayos (6 por cada pool) el factor aleatorio. En el segundo experimento, las diferencias funcionales en los espermatozoides descongelados y sometidos o no a un tratamiento de capacitación, fueron también evaluadas mediante un ANOVA mixto en el que el pool de semen (A y B), la velocidad de enfriamiento (0'08, 0'13, 0'4 y 1'5 °C/min) y el tratamiento (capacitación o no) fueron los factores fijos, siendo los ensayos (6 por cada pool) el factor aleatorio. Previo a los análisis, los datos en porcentaje fueron transformados mediante la función arcoseno. Cuando el ANOVA reveló diferencias significativas, los datos fueron comparados utilizando el test de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $P \leq 0'05$. Los resultados se presentan como medias, aritmética o cuadrática, \pm error estándar de la media (SEM).

IV. RESULTADOS

4.1.- Características espermáticas de los dos pools de semen antes de la congelación.

Todos los eyaculados procedían de verracos ubicados en dos centros de IA que eran utilizados en los programas rutinarios de producción de dosis seminales para la IA. Aunque ésta premisa indicaría que todos los eyaculados deberían de tener unas características espermáticas similares dentro de un rango de alta calidad, la realidad demostró que existían diferencias significativas entre pools en la calidad espermática antes de la criopreservación. Tal y como se recoge en la Tabla 6, el pool A, respecto al pool B, presentaba porcentajes significativamente ($P < 0'001$) más altos de espermatozoides morfológicamente normales, móviles totales y con movimiento rápido y progresivo. Además presentaba porcentajes significativamente ($P < 0'001$) más bajos de espermatozoides hiper móviles. No observándose diferencias significativas ($P > 0'05$) entre ambos pools ni en la concentración espermática ni en el porcentaje de espermatozoides viables.

Tabla 6. Parámetros seminales de los dos pools seminales antes de la congelación.

Parámetros seminales ¹	Semen			
	Pool A		Pool B	
	media±SEM	Rango	media±SEM	Rango
Concentración espermática ($\times 10^6$ /mL)	322'0±12'8	210-450	334'1±14'0	200-530
Morfología espermática ² (%)	89'4±1'1 ^a	80-99	79'7±2'1 ^b	57-94
Motilidad espermática total (%)	87'1±0'8 ^a	85.4-89.2	77'5±0'9 ^b	71'6-80'6
Motilidad rápida y progresiva (%)	9'0±1'5 ^a	4.6-15.3	3'0±0'7 ^b	0'5-6'0
Espermatozoides hiper móviles (%)	8'4±1'7 ^a	3.5-14.4	24'0±4'6 ^b	5'6-40'0
Viabilidad espermática total (%)	94'3±0'5	90.6-97.1	93'3±0'3	90'2-95'1

¹Fracción rica diluida (1:1, v/v in BTS) al momento de llegar al laboratorio.

²El valor de la morfología espermática representa el porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

^{a,b}Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de las filas ($P < 0.001$).

4.2.- Sub-poblaciones de espermatozoides móviles.

A lo largo del proceso de congelación (a los 5 °C) y descongelación (a los 30 y 150 min de incubación en un baño termostatzado a 37 °C), un total de 142.751 espermatozoides móviles fueron registrados individualmente y su cinética de movimiento fue definida en base a 5 parámetros cinemáticos, VCL, VSL, LIN, STR y ALH (Tabla 2). Tres de dichos parámetros (VCL, LIN y STR) fueron empleados para definir la sub-población de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo, la cual estaba comprendida por los espermatozoides que mostraban una VSL $\geq 40 \mu\text{m/s}$, una LIN $\geq 50 \%$ y una STR $\geq 75 \%$. La segunda sub-población, la de espermatozoides hipermóviles, estaba definida por los parámetros cinemáticos VCL, LIN y ALH, estando comprendida por aquellos espermatozoides móviles que presentaban una VCL $\geq 97 \mu\text{m/s}$, una LIN $\leq 35\%$ y una ALH $\geq 3.5 \mu\text{m/s}$. El número de espermatozoides de cada sub-población y para cada pool de semen así como el porcentaje que dichas sub-poblaciones representan sobre la población total de espermatozoides móviles, se muestra en la Tabla 7. El pool de semen A presentaba un porcentaje mayor significativamente ($P < 0.001$) de espermatozoides con motilidad rápida y progresiva y un porcentaje significativamente ($P < 0.001$) menor de espermatozoides hipermóviles. Además, el valor medio de los diferentes parámetros cinemáticos que definen las dos sub-poblaciones también mostró ser diferente entre pools. Diferencias que, exceptuando para el parámetro STR en la sub-población de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo, fueron significativamente diferentes ($P < 0.001$). Los espermatozoides con movimiento rápido y progresivo del pool B dibujaban una trayectoria media más larga (mayor VSL) y más lineal (mayor LIN) que los del pool A. En contra, el pool B no solo tenía un mayor porcentaje de espermatozoides hipermóviles, sino que, además, éstos dibujaban trayectorias medias más vigorosas (mayor VCL), muy poco lineales (menor LIN) y con una mayor amplitud de movimiento lateral de la cabeza (mayor ALH).

Tabla 7. Medias \pm SEM de las características de movimiento cinemático de cada una de las dos sub poblaciones espermáticas con datos provenientes del CASA*.

Subpoblación espermática	Semen	Nº de esperm (%) ¹	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH ($\mu\text{m/s}$)
Espermatozoides rápidos y progresivos	A	16,552 (20'6) ^a		59'1 \pm 0'1 ^a (40-121)	79'0 \pm 0'1 ^a (50-100)	88'9 \pm 0'1 (75-100)	
	B	10,102 (16'2) ^b		59'7 \pm 0'1 ^b (40-110)	74'9 \pm 0'1 ^b (50-100)	88'8 \pm 0'1 (75-100)	
	Media	26,654		59'3 \pm 0'1	77'5 \pm 0'1	88'9 \pm 0'1	
Espermatozoides hipermóviles	A	10,347 (12'9) ^a	121'5 \pm 0'2 ^a (97-234)		16'7 \pm 0.1 ^a (0-35)		4'6 \pm 0'1 ^a (3'5-10)
	B	19,193 (30'8) ^b	132'4 \pm 0'2 ^b (97-253)		15'7 \pm 0'1 ^b (0-35)		5'2 \pm 0'1 ^b (3.5-12)
	Media	29,540	128'6 \pm 0'1		16'1 \pm 0'1		5'0 \pm 0'1
Población total de espermatozoides móviles	A	80,352	78'7 \pm 0'1 ^a (10-234)	31'4 \pm 0'1 ^a (0-121)	43'7 \pm 0'1 ^a (0-100)	53'2 \pm 0'1 ^a (0-100)	2'6 \pm 0'1 ^a (0.4-10)
	B	62,399	89'8 \pm 0'2 ^b (10-253)	28'6 \pm 0'1 ^b (0-110)	36'9 \pm 0'1 ^b (0-100)	49'7 \pm 0'1 ^b (0-100)	3'4 \pm 0'1 ^b (0'4-12)
	Media	142,751	83'5 \pm 0'1	30'1 \pm 0'1	40'7 \pm 0'1	51'7 \pm 0'1	3'0 \pm 0'1

* CASA se refiere al análisis espermático asistido por computadora; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; LIN, linealidad; STR, rectitud; ALH, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza.

¹Los números entre paréntesis indican el porcentaje de la subpoblación espermática respecto de la población total de espermatozoides móviles para cada pool de semen.

^{a,b}Valores con diferentes superíndices dentro de cada columna y población espermática difieren en $P < 0'001$.

4.3.- Influencia de la velocidad de enfriamiento en el patrón de calidad espermática a lo largo del proceso de congelación-descongelación.

La calidad espermática fue evaluada en tres etapas del proceso de congelación-descongelación, primero cuando se completa el enfriamiento hasta los 5 °C y se le añade el crioprotector, después ya descongelado a los 30 min de incubación a 37 °C y, por último, a los 150 min de incubación. Los factores fijos contemplados en el estudio fueron el pool de semen, la velocidad de enfriamiento y las etapas del proceso de congelación-descongelación. Los resultados del ANOVA para cada una de las variables de calidad espermática se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. ANOVA para las fuentes de variación en los parámetros de calidad espermática de semen porcino bajo un proceso de congelado y descongelado.

Parámetros	Fuente	gl	F	P
Total de Espermatozoides móviles	Semen (SP)	1	38'96	0'0001
	Tasa de congelación (CR)	3	1'40	0'243
	Etapa del F-T (FTS)	2	360'87	0'0001
	SP x CR	3	0'26	0'856
	SP x FTS	2	10'86	0'0001
	CR x FTS	6	0'66	0'678
	SP x CR x FTS	6	0'40	0'881
Espermatozoides móviles rápidos y progresivos	Semen (SP)	1	4'23	0'042
	Tasa de congelación (CR)	3	0'22	0'879
	Etapa del F-T (FTS)	2	157'97	0'0001
	SP x CR	3	0'50	0'684
	SP x FTS	2	0'17	0'847
	CR x FTS	6	0'35	0'908
	SP x CR x FTS	6	0'36	0'900
Espermatozoides hiper móviles	Semen (SP)	1	82'29	0'0001
	Tasa de congelación (CR)	3	0'63	0'597
	Etapa del F-T (FTS)	2	384'45	0'0001
	SP x CR	3	0'09	0'964
	SP x FTS	2	28'40	0'0001
	CR x FTS	6	0'54	0'777
	SP x CR x FTS	6	0'06	0'999
Espermatozoides vivos con acrosoma intacto	Semen (SP)	1	21'22	0'0001
	Tasa de congelación (CR)	3	1'72	0'164
	Etapa del F-T (FTS)	2	528'59	0'0001
	SP x CR	3	1'47	0'225
	SP x FTS	2	0'83	0'439
	CR x FTS	6	1'04	0'402
	SP x CR x FTS	6	0'70	0'651
Volúmen celular medio (μm^3) MCV	Semen (SP)	1	0'39	0'542
	Tasa de congelación (CR)	3	0'62	0'604
	Etapa del F-T (FTS)	2	1'65	0'195
	SP x CR	3	0'54	0'656
	SP x FTS	2	4'44	0'013
	CR x FTS	6	0'26	0'953
	SP x CR x FTS	6	0'67	0'672

gl: indican los grados de libertad.

Destacar que el pool de semen influyó significativamente ($P < 0'05$) en todas las variables de calidad espermática con la excepción del volumen celular medio y lo que es más relevante, que la velocidad de enfriamiento no tuvo influencia significativa ($P > 0'05$) para ninguna de las variables estudiadas. También, como era de esperar, las etapas del proceso de congelación-descongelación tuvieron una influencia significativa ($P < 0'001$) en todos los parámetros de calidad espermática con la excepción de nuevo del volumen celular medio. En cuanto a las interacciones, tan solo fue significativa ($P < 0'001$) entre el pool de semen y las etapas del proceso de congelación y para los porcentajes del total de espermatozoides móviles y el de hiper móviles.

Tabla 9. Efectos de la velocidad de enfriamiento sobre los parámetros de calidad espermática del semen A, efectuados durante el proceso de congelado y descongelado.

Parámetros de motilidad espermática	Etapas del proceso de congelado-descongelado		Velocidad de enfriamiento (°C/min)			
			0'08	0'13	0'40	1'50
Total de espermatozoides móviles (%)	A 5°C		83'2 ^a	83'7 ^a	81'5 ^a	84'8 ^a
	Post descongelado e incubado a 37°C:	30 min	62'9 ^b	64'3 ^b	61'1 ^b	66'7 ^b
		150 min	35'1 ^c	39'3 ^c	37'3 ^c	39.1 ^c
	SEM		2'9	2'5	2'5	1.8
Espermatozoides móviles rápidos y progresivos (%)	A 5°C		4'5 ^a	9'9 ^a	3'5 ^a	4'3 ^a
	Post descongelado e incubado a 37°C:	30 min	27'3 ^b	30'4 ^b	32'3 ^b	33'9 ^b
		150 min	29'1 ^b	30'3 ^b	31'6 ^b	29'4 ^b
	SEM		1'5	4'2	1'7	2'4
Espermatozoides hiper móviles (%)	A 5°C		30'0 ^a	33'2 ^a	36'4 ^a	37'1 ^a
	Post descongelado e incubado a 37°C:	30 min	1'8 ^b	2'5 ^b	3'1 ^b	4'4 ^b
		150 min	3'5 ^b	1'2 ^b	1'7 ^b	1'8 ^b
	SEM		3'9	4'2	4'7	4'1
Espermatozoides vivos con acrosoma intacto (%)	A 5°C		91'8 ^a	94'4 ^a	94'1 ^a	92'5 ^a
	Post descongelado e incubado a 37°C:	30 min	66'3 ^b	65'2 ^b	63'4 ^b	65'4 ^b
		150 min	63'7 ^b	61'3 ^b	62'0 ^b	62'6 ^b
	SEM		1.4	2'2	1'8	1'8
Volúmen celular medio (µm ³)	A 5°C		425.6	435'8	420'4	430'6
	Post descongelado e incubado a 37°C:	30 min	469.1	452'1	452'9	464'0
		150 min	441.7	451'4	442'7	462'5
	SEM		13.8	11'3	12'4	10'1

^{a,b} Valores con diferentes superíndices dentro de cada columna y cada parámetro de calidad espermática difieren entre las etapas del proceso de congelado descongelado en $P < 0'001$.

Teniendo en cuenta la significativa influencia del pool de semen para la mayoría de los parámetros de calidad espermática evaluados, los resultados se presentan de manera independiente para cada pool de semen (Tablas 9 y 10). En términos generales el pool A presenta mejores resultados de calidad espermática que el pool B. Lo cual queda reflejado por mostrar mayores porcentajes de espermatozoides móviles totales, con movimiento rápido y progresivo y también de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, y menor porcentaje de espermatozoides hiper móviles.

Tabla 10. Efectos de la velocidad de enfriamiento sobre los parámetros de calidad espermática del semen B, efectuados durante el proceso de congelado y descongelado.

Parámetros de motilidad espermática	Etapas del proceso de congelado-descongelado		Velocidad de enfriamiento (°C/min)			
			0'08	0'13	0'40	1'50
Total de espermatozoides móviles (%)	A 5 °C		80'2 ^a	78'6 ^a	78'8 ^a	76'5 ^a
	Post descongelado e incubado a 37 °C:	30 min	46'9 ^b	38'8 ^b	48'6 ^b	51'0 ^b
		150 min	32'4 ^c	31'8 ^b	33'3 ^c	33'8 ^c
	SEM		3'5	3'9	4'6	4'4
Espermatozoides móviles rápidos y progresivos (%)	A 5 °C		3'9 ^a	2'9 ^a	4'8 ^a	3'3 ^a
	Post descongelado e incubado a 37 °C:	30 min	31'1 ^b	29'1 ^b	29'9 ^b	31'7 ^b
		150 min	26'9 ^b	26'9 ^b	29'5 ^b	27'4 ^b
	SEM		3'4	4'0	4'5	3'6
Espermatozoides hiper móviles (%)	A 5 °C		57'3 ^a	56'8 ^a	61'6 ^a	61'7 ^a
	Post descongelado e incubado a 37 °C:	30 min	7'3 ^b	6'1 ^b	7'4 ^b	5'8 ^b
		150 min	6'8 ^b	5'1 ^b	6'6 ^b	6'1 ^b
	SEM		2'3	2'9	2'3	2'3
Espermatozoides vivos con acrosoma intacto (%)	A 5 °C		90'6 ^a	90'2 ^a	91'7 ^a	91'1 ^a
	Post descongelado e incubado a 37 °C:	30 min	60'6 ^b	61'0 ^b	51'0 ^b	55'2 ^b
		150 min	55'5 ^b	57'9 ^b	46'3 ^b	50'0 ^b
	SEM		2'9	3'1	3'1	2'9
Volúmen celular medio (µm ³)	A 5 °C		426'3	436'3	436'7	423'3
	Post descongelado e incubado a 37 °C:	30 min	418'5	422'3	427'3	433'7
		150 min	439'6	435'4	432'6	450'9
	SEM		14'2	14'5	10'5	18'3

^{a,b} Valores con diferentes superíndices dentro de cada columna y cada parámetro de calidad espermática difieren entre las etapas del proceso de congelado descongelado en P < 0'001.

En cuanto a cada uno de los dos pools de semen, indicar que ambos muestran un mismo patrón de variación entre las tres etapas del proceso de congelación-descongelación para cada una de los parámetros o variables de calidad espermática. Dicha tendencia o patrón muestra, por un lado, una progresiva pérdida de calidad, la cual se ve particularmente reflejada en los porcentajes de espermatozoides móviles totales y vivos con el acrosoma intacto. Por otro lado, indica un cambio en el patrón de movimiento espermático el cual se ve reflejado por un descenso en el porcentaje de espermatozoides hiper móviles y un incremento en el de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo. Ambos son particularmente evidente entre la etapa de 5 °C y la siguiente a los 30 min post-descongelación.

4.4. Influencia de la velocidad de enfriamiento en la respuesta de los espermatozoides congelados-descongelados a un tratamiento de capacitación espermática.

Los espermatozoides congelados siguiendo protocolos que incluían las diferentes velocidades de enfriamiento en estudio, fueron, a su descongelación, incubados en un medio capacitante con el objetivo de evaluar su capacidad funcional de respuesta. Dicha capacidad, que se comparó con la mostrada por los espermatozoides incubados en un medio no capacitante, se valoró en términos de cambios en la estabilidad de membrana, grado de apoptosis temprana y producción intracelular de ROS a los 30 y 150 min post-descongelación. Los factores finales fijos contemplados en el estudio fueron el pool de semen, la velocidad de enfriamiento y el medio de incubación (capacitante vs control). El tiempo de incubación post-descongelación, 30 y 150 min, fue inicialmente contemplado en el estudio como factor fijo pero a pesar de mostrar una influencia significativa ($P < 0'05$) para todos los parámetros o variables de funcionalidad espermática, fue finalmente eliminado como tal y sus valores promediados al no mostrar interacción con ninguna de los restantes factores fijos estudiados. Los resultados del ANOVA para cada una de las variables de funcionalidad espermática se recogen en la Tabla 11. Destacar, como era de esperar que el medio (capacitante vs control) influyó significativamente ($P < 0'001$) en todas las variables de funcionalidad espermática. En cuanto a la velocidad de enfriamiento, al igual que con los parámetros o variables de calidad espermática, no tuvo

influencia significativa ($P > 0'05$) para ninguna de las variables de funcionalidad espermática estudiadas. El pool de semen influyó significativamente ($P < 0'001$) tan solo en los cambios en la estabilidad de la membrana plasmática, mostrando el pool A porcentajes más elevados, independientemente del medio de incubación y de la velocidad de enfriamiento. En cuanto a las interacciones, tan solo fue significativa ($P < 0'05$) entre el pool de semen y el medio (capacitante o no) y para los cambios en la estabilidad de membrana.

Tabla 11. ANOVA para las fuentes de variación en las mediciones de funcionalidad del semen porcino post descongelado incubado en una medio capacitante.

Parámetro	Fuente	gl	F	P
Espermatozoide viable con una membrana plasmática inestable	Semen (SP)	1	60'87	0'0001
	Tasa de enfriamiento (CR)	3	1'42	0'240
	Medio (M)	1	741'41	0'0001
	SP x CR	3	0'42	0'742
	SP x M	1	4'47	0'036
	CR x M	3	0'39	0'777
	SP x CR x M	3	0'16	0'925
Espermatozoides con apoptosis inicial	Semen (SP)	1	2'02	0'157
	Tasa de enfriamiento (CR)	3	1'71	0'166
	Medio (M)	1	31'55	0'0001
	SP x CR	3	2'59	0'054
	SP x M	1	3'06	0'082
	CR x M	3	0'25	0'860
	SP x CR x M	3	0'11	0'943
Producción intracelular de ROS inducida	Semen (SP)	1	0'13	0'909
	Tasa de enfriamiento (CR)	3	0'32	0'808
	Medio (M)	1	1478'85	0'0001
	SP x CR	3	0'34	0'794
	SP x M	1	0'11	0'737
	CR x M	3	0'48	0'697
	SP x CR x M	3	0'22	0'880

gl: indican los grados de libertad.

Los resultados de funcionalidad espermática para cada pool de semen y en función del medio de incubación (capacitante o control) se recogen en las Tablas 12. El medio de capacitación, como era de esperar, provocó cambios significativos ($P < 0'001$) en los tres

parámetros de calidad espermática evaluados, reflejado por un incremento significativo ($P < 0'001$) en los porcentajes de espermatozoides viables y con membrana espermática inestable, y en los de apoptosis temprana, y también en la producción intracelular de ROS, en las muestras incubadas en medio capacitante.

Tabla 12. Respuesta de los espermatozoides congelados-descongelados enfriados a diferentes tasas incubados en un medio capacitante.

Parámetros de funcionalidad espermática	Velocidad de Enfriado	Semen pool A		Semen pool B	
		TBM	TBMc	TBM	TBMc
Espermatozoides viable con membrana plasmática inestable (%)	0'08	12'5 ^a	39'2 ^b	6'3 ^a	28'3 ^b
	0'13	11'6 ^a	38'7 ^b	6'4 ^a	29'1 ^b
	0'40	11'1 ^a	37'7 ^b	5'5 ^a	30'4 ^b
	1'50	9'5 ^a	34'9 ^b	5'9 ^a	26'8 ^b
	SEM	1'1	2'7	0'7	2'0
Espermatozoides vivos con apoptosis inicial (%)	0'08	29'2 ^a	41'4 ^b	22'7 ^a	28'6 ^b
	0'13	26'8 ^a	37'3 ^b	26'8 ^a	31'6 ^b
	0'40	26'9 ^a	40'4 ^b	28'2 ^a	37'1 ^b
	1'50	25'8 ^a	40'8 ^b	33'5 ^a	40'7 ^b
	SEM	3'8	2'3	4'8	2'4
Producción intracelular de ROS (FU/10 ¹² espermatozoides vivos)	0'08	2'1 ^a	21'5 ^b	1'9 ^a	20'3 ^b
	0'13	2'3 ^a	20'6 ^b	2'4 ^a	19'6 ^b
	0'40	2'1 ^a	20'8 ^b	2'6 ^a	21'5 ^b
	1'50	2'2 ^a	21'2 ^b	2'2 ^a	21'8 ^b
	SEM	0'2	1'3	0'2	1'4

TBM: Medio Tris-buffer; TBMc: Medio Tris-buffer suplementado con CaCl₂*2H₂O, Cafeína y BSA.

^{a,b}Valores con diferentes superíndices dentro de cada pool de semen difieren entre TBM y TBMc en $P < 0.001$.

V. DISCUSIÓN

El proceso de criopreservación espermática comprende tres etapas en las que a los espermatozoides se les somete a importantes cambios de temperatura. La primera etapa, denominada de **enfriamiento**, comprende el descenso de temperatura desde los 21-16 °C, temperatura a la que se centrifuga el semen para eliminar el plasma seminal, hasta los 5 °C, momento en el que se agrega el crioprotector y los espermatozoides son envasados para su posterior congelación. La segunda etapa que contempla cambios de temperatura es la de **congelación** propiamente dicha, etapa que comprende el descenso térmico desde los 5 °C hasta los -140 °C, temperatura ésta última en la que los espermatozoides son introducidos en el interior de tanques con nitrógeno líquido para garantizar su conservación *sine die*. Por último, la tercera etapa del proceso de criopreservación espermática que implica cambios de temperatura es la de **descongelación**, cuando los espermatozoides son calentados desde los -179 °C, temperatura a la que se encontraban mientras estaban sumergidos en el nitrógeno líquido, hasta los 22 ó 37 °C, temperaturas a las que se manipulan los espermatozoides para su empleo en inseminación artificial, o para evaluar su calidad y/o funcionalidad, respectivamente. La velocidad con la que se proceda en cada una de estas etapas resulta crucial para la criosupervivencia espermática. Además, las diferencias inter-especie en las propiedades biofísicas y/o bioquímicas de los espermatozoides, obliga a tener que adoptar velocidades diferentes para cada especie animal. En este sentido, comentar, que los esfuerzos científicos en cuanto a que velocidades son más apropiadas para los espermatozoides de porcino, se han centrado casi exclusivamente en la velocidad de congelación, y particularmente en el descenso de temperatura desde los -5 °C hasta los -40 °C ya que este rango de temperatura al producirse la cristalización del medio acuoso, los espermatozoides están sometidos a bruscos cambios de presión osmótica con importantes repercusiones en la permeabilidad de sus membranas (Woelders y cols., 2005). Al respecto ha quedado demostrado que velocidades relativamente altas, de entre -30 y -40 °C/min, son, para dicho intervalo, más apropiadas que velocidades más lentas, ya que permiten encontrar el equilibrio entre la formación de cristales de hielo y el denominado efecto soluto (Devireddy y cols., 2004; Hernandez y cols., 2007a; Holt y cols., 2005). Para llegar a dicha conclusión, además, no se han escatimado esfuerzos

tecnológicos para estudiar los cambios de permeabilidad que experimentan las membranas espermáticas durante la congelación. Así, por ejemplo, se han empleado colorímetros capaces de detectar diferencias en la forma celular (a shape-independent differential scanning calorimeter, Deviderry y cols., 2004), criomicroscopios (Holt y cols., 2005) o citómetros de flujo (Hernández y cols., 2007a). Aunque menos, también existen estudios que han evaluado la importancia que la velocidad de calentamiento o descongelación tiene para la criosupervivencia de los espermatozoides de porcino. Al respecto, Hernández y cols. (2006, 2007b) demostraron que velocidades altas, de unos 1800 °C/min, son más apropiadas que las clásicamente empleadas de 1200 °C/min, y particularmente cuando los espermatozoides están envasados en pajuelas de 0'5 mL. En resumen, podemos decir que para criopreservar los espermatozoides de porcino son recomendables velocidades relativamente altas para congelar y muy altas para descongelar.

En cuanto a la velocidad de enfriamiento, siempre se ha hecho hincapié en que los espermatozoides de mamíferos en general, y de porcino en particular, son especialmente sensibles al enfriamiento en el rango comprendido entre los 15 y 5 °C, recomendándose velocidades lentas de enfriamiento con el objetivo de prevenir y/o evitar el tan temido estrés térmico o shock por frío al que se les supone son muy sensibles los espermatozoides de porcino, debido a las peculiares características estructurales de sus membranas ya que la fase de transición de los lípidos de membrana en los espermatozoides de porcino acontece entre las arriba mencionadas temperaturas (Watson, 2000; Silva y Gadella, 2005). Entonces, ha sido y sigue, actualmente, siendo todavía común emplear velocidades de enfriamiento tan lentas como 0'06 °C/min (Frazer y Strzezek, 2005), 0'08 °C/min (Hernández y cols., 2007b), 0'1°C/min, 0'18 °C/min (Saravia y cols., 2009b) ó 0'2 (Thurston y cols., 2002) para el descenso de temperatura desde los 15 y los 5 °C. Sugiriéndose que velocidades más rápida de enfriamiento pueden producir daños irreversibles en las membranas a una elevada población espermática (ver reciente revisión de Barbas y Mascarenhas, 2009). Ahora bien, a diferencia de lo que ocurre con las velocidades de congelación y descongelación, la enfatizada necesidad de emplear velocidades muy lentas en los protocolos de criopreservación espermática no está sustentada en razones o evidencias científicas. El porqué es claro, no se han realizado estudios científicos destinados a evaluar la repercusión de la velocidad de

enfriamiento en la criosupervivencia espermática. Este estudio es el primero que pretende evaluar como la velocidad de enfriamiento influye sobre la calidad y funcionalidad de los espermatozoides de porcino sometidos a un proceso de criopreservación. Para ello, hemos evaluado 4 velocidades de enfriamiento situadas en un rango entre 0'08 y 1'50 °C/min. Velocidades que, a simple vista, todas ellas podrían ser consideradas como muy lentas, principalmente si tenemos en cuenta las velocidades anteriormente mencionadas y empleadas para la congelación y descongelación. Ahora bien, es importante añadir que pasar de las velocidades de enfriamiento tradicionalmente empleadas, entre los 0'06 y 0'18 °C/min, a la velocidad de 1'50 °C/min, supone incrementar la rapidez de enfriamiento entre un 250 y 833%.

Los resultados del presente trabajo demuestran que la calidad espermática a lo largo del proceso de congelación-descongelación y la funcionalidad de los espermatozoides congelados-descongelados de porcino, no se ven alteradas cuando dichos espermatozoides se someten a velocidades de enfriamiento más rápidas que las habitualmente recomendadas para el descenso de temperatura entre los 17 y 5 °C contemplado en todos los protocolos de criopreservación. Estos resultados pueden ser considerados como sorprendentes en la medida que desde que se inició la criopreservación de eyaculados en la especie porcina, allá por los años 70, y hasta la fecha, casi 40 años después, siempre se ha creído en la imperiosa necesidad de enfriar muy lentamente a los espermatozoides para prevenir y/o evitar el tan temido estrés térmico o shock por frío al que se les supone son muy sensibles los espermatozoides de porcino. Pero, por otro lado, dicha sorpresa debe ser considerada como relativa en base a tres razones. La primera, por la ausencia de una base científica sólida que sustentara la creencia de tener que emplear velocidades lentas o muy lentas de enfriamiento. La segunda, por el contrasentido que supone recomendar para los protocolos de criopreservación espermática de porcino el empleo de velocidades muy lentas de enfriamiento junto con velocidades rápidas de congelación y muy rápidas para la descongelación. Y por último, por la existencia de algunos estudios, apenas dos, en los que se han criopreservado con éxito espermatozoides de rumiantes empleando velocidades de enfriamiento relativamente altas (Januskaukas y cols., 1999; Fernández-Santos y cols., 2006). Entonces, es evidente que los espermatozoides de porcino si son capaces de soportar velocidades rápidas de congelación y descongelación sin

repercusiones negativas sobre su integridad y funcionalidad, también es coherente que sean capaces de soportar velocidades de enfriamiento relativamente rápidas.

La evidencia de la capacidad de los espermatozoides de porcino sometidos a un proceso de criopreservación para soportar velocidades relativamente rápidas de enfriamiento, entendemos queda demostrada por la inexistencia de variaciones significativas, tanto en la calidad como en la funcionalidad post-descongelación, observadas entre los espermatozoides enfriados siguiendo las tradicionales recomendaciones de utilizar velocidades lentas (los 0'08 °C/min empleados como control) y aquellos enfriados a velocidades más rápidas, de incluso hasta los 1'50 °C/min. Para valorar la calidad espermática, los criterios empleados han sido el porcentaje de espermatozoides móviles, la cinética de su movimiento, empleada para definir poblaciones espermáticas, y el porcentaje de espermatozoides con las de las membranas plasmática y acrosomal íntegras. Evaluar la motilidad espermática y la cinética del movimiento es importante, no solo porque la capacidad de movimiento representa la mejor evidencia de la expresión de viabilidad e integridad estructural de la célula espermática (Davis y Siemers, 1995), sino también porque es el parámetro de calidad espermática que mejor se correlaciona con la fertilidad in vivo en la especie porcina (Holt y cols., 1997). Además, gracias a los sistemas CASA, podemos identificar el movimiento espermático con variados parámetros de cinética de movimiento que, entre otras cosas, nos permiten agrupar los espermatozoides móviles en diferentes poblaciones según sea su patrón de movimiento (Cremades y cols., 2005). En el presente trabajo no hemos observado diferencias entre las velocidades de enfriamiento ni en el porcentaje total de espermatozoides móviles ni en el los correspondientes a las poblaciones de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo y de hiper móviles. Es especialmente relevante la ausencia de diferencias en la población de espermatozoides hiper móviles habida cuenta que el estrés térmico o shock por frío, asociado a un enfriamiento inadecuado, provoca cambios en el patrón de movimiento espermático que se ven reflejados por un significativo aumento de la población de espermatozoides con movimiento vigoroso pero no rectilíneo. Población ésta que reúne las características cinéticas de movimiento propias de los espermatozoides hiper móviles y cuyo patrón de motilidad está asociado al estado de capacitación espermática, que fisiológicamente solo debería mostrar en el tracto genital femenino en el momento de la fecundación una

elevada población de espermatozoides (Ho y Suarez, 2001). No obstante, es conocido que la capacidad fecundante de una importante población de los espermatozoides que son capaces de soportar el proceso de criopreservación, se ve seriamente comprometida por sufrir un proceso precoz de capacitación espermática, también llamado crio-capacitación o falsa capacitación espermática (Watson 1995). Proceso que ya puede ser observado en los espermatozoides después del enfriamiento a 5 °C (Fuller y Whittingham, 1996; 1997; Green y Watson, 2001) y que, entre otros cambios, se vería reflejado por un patrón de hipermotilidad. Efectivamente, porcentajes de espermatozoides hiper mótilos tan altos como del 30-40 % aparecen a los 5 °C, lo cual desgraciadamente debemos considerarlo normal con los actuales protocolos de criopreservación (Cremades y cols., 2005). Lo relevante para este estudio es que dicho porcentaje no difiere entre las diferentes las velocidades de enfriamiento estudiadas, por lo que podemos considerar que velocidades más rápidas de enfriamiento no redundan negativamente en un incremento de la población espermática que sufre el proceso de crio-capacitación o falsa capacitación espermática durante la criopreservación.

El proceso de criopreservación, que incluye la etapa de enfriamiento, induce daños estructurales y bioquímicos irreversibles a las células espermáticas que repercuten directamente sobre las membranas espermáticas alterando su estructura y funcionalidad (Parks y Graham, 1992; Harrison y cols., 1996; Holt y Medrano, 1997). Es más, la especial sensibilidad de los espermatozoides de porcino al estrés del enfriamiento (Watson, 1981; Watson y Plummer, 1985), motiva que se le atribuya al enfriamiento de las células espermáticas hasta los 5 °C una alta responsabilidad del elevado porcentaje de espermatozoides que pierden, de manera irreversible, la integridad de las membranas plasmática y acrosomal durante el proceso de criopreservación (Watson, 1979). Entonces, parece lógico que determinar el porcentaje de espermatozoides con integridad de las membranas plasmática y acrosomal, sea actualmente considerada la prueba analítica más fiable para valorar el daño directo e inmediato ocasionado por el proceso de criopreservación, y en particular por el estrés por enfriamiento sufrido durante la criopreservación. La mejor evidencia de estas afirmaciones es observar la drástica caída acontecida durante el proceso de criopreservación en el porcentaje de espermatozoides con membranas íntegras. Caída que en ninguna manera puede ser atribuida a las diferentes velocidades de enfriamiento, habida cuenta que no se aprecian diferencias ni

inmediatamente después de la etapa de enfriamiento, es decir a los 5 °C, ni a la descongelación en el porcentaje de espermatozoides con las membranas plasmática y acrosomal íntegras entre las diferentes velocidades estudiadas.

Los efectos nocivos que ejerce la criopreservación sobre la célula espermática van desde provocar daños letales, y por lo tanto irreversibles, hasta otros que se reflejan por una pérdida de respuesta o funcionalidad de los espermatozoides que aparentan haber superado el proceso de criopreservación (Watson, 1995). Para evaluar la posible pérdida de respuesta o funcionalidad es necesario provocar o inducir en los espermatozoides criosupervivientes respuestas funcionales lógicas para espermatozoides con plenitud funcional. Una de las respuestas funcionales más representativas y también fundamental para el devenir funcional de los espermatozoides es la capacidad de éstos por sufrir la capacitación espermática, que como ya hemos dicho es un evento fisiológico necesario para que la célula espermática pueda penetrar y consecuentemente fecundar al ovocito. En el presente estudio, el proceso de capacitación espermática *in vitro* fue provocado mediante la incubación a 39 °C de los espermatozoides en el medio TBMc. Como control, y para determinar la justa capacidad en la respuesta de los espermatozoides congelados-descongelados por sufrir la verdadera capacitación espermática, una sub-muestra espermática fue incubada en un medio no capacitante. La respuesta funcional de los espermatozoides congelados-descongelados fue evaluada en términos del grado de desestabilización de la membrana plasmática, apoptosis celular y la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas. La desestabilización de la membrana plasmática fue evaluada mediante el empleo del fluorocromo Merocianina 540 que ha demostrado ser útil para detectar los cambios en la fluidez de la membrana plasmática que son propios de la capacitación espermática (Harrison y cols., 1996; Flesch y cols., 1999). Una significativa población de los espermatozoides congelados-descongelados responde a la incubación en medio capacitante con una gran desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, como por otro lado era de esperar (Green y Watson, 2001). Sin embargo, lo verdaderamente relevante para nuestro estudio es que dicha población no varía en función de la velocidad de enfriamiento. Esta relevante circunstancia indica claramente que si el enfriamiento es responsable de cambios en la fluidez de las membranas espermáticas, dichos cambios ocurren independientemente de la velocidad de enfriamiento, al menos en el rango entre 0'08 y 1'50 °C/min.

Al proceso de criopreservación se le atribuye la capacidad de producir daños subletales a una importante población de los espermatozoides crio-superviviente. Daños que, a dicha población, le imposibilitaría para poder desarrollar en plenitud su funcionalidad y por lo tanto le impediría poder fecundar (Peña, 2007). Uno de los mejores procedimientos analíticos que disponemos actualmente para determinar la presencia de daños subletales es el que utiliza al fluorocromo Annexin V, fluorocromo capaz de detectar la denominada apoptosis celular. Como era de esperar, una importante población espermática crio-superviviente evidencia apoptosis celular, población que se ve aumentada cuando los espermatozoides son incubados en medios capacitante. Estos resultados, con cierto grado de coincidencia con los anteriormente publicados por Roca y cols. (2004), ponen de evidencia que efectivamente una importante población de espermatozoides crio-supervivientes tiene limitada en el tiempo su supervivencia funcional. Sin embargo, es notorio también, y particularmente para el objetivo de nuestro estudio, que los porcentajes de espermatozoides apoptóticos son independientes de la velocidad empleada para la etapa de enfriamiento. Lo cual indicaría, al igual de lo ya observado en la desestabilización de la bicapa lipídica, que las alteraciones que sufren las membranas espermáticas durante el proceso de criopreservación y la posterior respuesta funcional de las membranas de la población de espermatozoides crio-supervivientes es independiente de la velocidad en el descenso de temperatura empleada durante la etapa de enfriamiento.

La última prueba de funcionalidad espermática fue la determinación de la producción intra-espermática de sustancias oxígeno reactivas. Para lo cual empleamos la técnica de citometría que combina dos fluorocromos, el yoduro de propidio, que penetra en los espermatozoides con pérdida de integridad de membrana y por lo tanto considerados como muertos, y CM-H₂DCFDA para determinar los niveles de producción de ROS. Con dicha combinación se puede de identificar la producción intracelular de ROS que corresponde a la población de espermatozoides viables a la descongelación (Vasco y cols., 2008). Con esta técnica, la ROS que se determina, casi exclusivamente, es el peróxido de hidrógeno (Carter y cols., 1994), que resulta ser la principal ROS producida por los espermatozoides de porcino sometidos al proceso de criopreservación (Roca y cols., 2005; Guthrie y Welch, 2006). Los niveles basales de ROS detectados, es decir aquellos obtenidos en las muestras de espermatozoides viables tras la congelación-

descongelación y posterior incubados en un medio no capacitante, son bajos, parecidos a los observados por Guthrie y Welch (2006) y Hernández y cols. (2007c), quienes además observan que dichos niveles no difieren de los encontrados en las mismas muestras espermáticas antes de someterlas al proceso de congelación-descongelación. Hecho éste que no forzosamente sería indicativo de que la criopreservación no induzca la producción de ROS, si no más bien que los espermatozoides viables a la descongelación producen cantidades similares de ROS intracelular que los frescos (Vasco y cols., 2008). En contrapartida, los niveles de ROS encontrados en las mismas muestras espermáticas incubadas a 39°C en un medio capacitante, son significativamente más altos. Lo cual parece indicar que las muestras espermáticas congeladas-descongeladas e incubadas en condiciones capacitantes, al menos una población significativa de las misma, responden a dicho estímulo, entre otras cosas, induciendo la producción intracelular de ROS. Al respecto, Vasco y cols. (2008) consideran que la determinación de los niveles de ROS en muestras espermáticas criopreservadas e incubadas en medios capacitantes, podría ser empleada para predecir el potencial funcional de los espermatozoides congelados-descongelados de porcino. Potencial funcional de los espermatozoides criopreservados que, en cualquier caso, no difiere entre las diferentes velocidades de enfriamiento empleadas. Vistos los resultados alcanzados con las diferentes pruebas evaluadoras de funcionalidad espermática, es coherente indicar que las velocidades alternativas empleadas para el enfriamiento de los espermatozoides desde los 17 a los 5 °C no repercuten negativamente en la respuesta funcional de los espermatozoides congelados-descongelados de porcino.

Otro hecho relevante y digno de ser analizado es la marcada diferencia observada entre los dos pools de semen empleados. Diferencia que se ha visto reflejada en varias de las pruebas analíticas de calidad y funcionalidad espermática realizadas. Este hecho, aunque relevante, no es sorprendente si tenemos en cuenta que cada pool de semen estaba formado por eyaculados procedentes de verracos que diferían en constitución genética y origen. Las diferencias entre verracos, y por lo tanto también puede que entre pools, en la congelabilidad espermática están plenamente demostradas (Roca y cols., 2006a,b; Rath y cols., 2009). Dichas diferencias, que podrían tener un origen genético ya que se han identificado diferentes marcadores moleculares ligados a genes que controlan la congelabilidad espermática entre verracos (Thurston y cols., 2002), se ha demostrado

que apenas existen entre eyaculados de un mismo verraco (Roca y cols., 2006a). Estos hechos, nos han permitido clasificar a los verracos como buenos, regulares y malos congeladores espermáticos (Hernández y cols., 2007a). A estas razones hay que atribuir el hecho que en el presente estudio hayamos experimentado con los dos pools por independiente. Además, siguiendo el criterio clasificatorio anterior, podríamos considerar que un pool de semen procede de verracos con buena congelabilidad espermática mientras que el otro procede de verracos con regular congelabilidad. Diferencias en la congelabilidad que ya intuíamos tras los criterios de cantidad y calidad que definían el semen fresco de cada uno de los dos pools, donde ya eran evidentes diferencias entre pools en los porcentajes de espermatozoides móviles y con morfología normal. Se ha demostrado que ambos porcentajes explican, en parte, la variabilidad observada entre eyaculados en la calidad espermática post-descongelación (Roca y cols., 2006a). El hecho de experimentar con dos pools de semen que diferían en sus características seminales en fresco y, también, en algunas valoraciones de calidad y funcionalidad espermática post-descongelación, ha sido de notable importancia para nuestro objetivo habida cuenta que la respuesta de los eyaculados de porcino a un determinado protocolo de criopreservación puede diferir sustancialmente según sea la crio-sensibilidad de sus espermatozoides (Hernández y cols., 2007b). Estos autores demostraron que los eyaculados con buena congelabilidad espermática respondían igual de bien a diferentes protocolos de criopreservación, mientras que los eyaculados con regular o mala congelabilidad mostraban diferencias importantes de crio-sensibilidad espermática en función del protocolo de criopreservación empleado. En el presente trabajo, en el que hemos utilizado cuatro protocolos de criopreservación que diferían entre ellos en la velocidad de enfriamiento, hemos constatado que la respuesta de los espermatozoides no difirió entre los dos pools de semen, a pesar de sus diferencias tanto en la calidad del semen fresco como en la calidad y funcionalidad de los espermatozoides congelados-descongelados. Respuesta que demostró que las velocidades de enfriamiento empleadas para el descenso de temperatura desde los 17 a los 5 °C no interferían la respuesta espermática al proceso de criopreservación, aunque dicha respuesta fuese diferente.

Probablemente, el razonamiento anterior, relativo a la coherencia en la capacidad de los espermatozoides de porcino para soportar velocidades rápidas de enfriamiento independientemente de su grado de congelabilidad, no pueda extraerse de otras

peculiaridades que caracterizan a cualquier protocolo de criopreservación espermática. Es decir, tal y como ocurre con las velocidades de congelación y descongelación, la velocidad de enfriamiento, deba ir estrechamente ligada a otras características que definen el protocolo de criopreservación espermática empleado. En concreto, el protocolo de criopreservación espermática empleado por nosotros, contempla que los eyaculados, su fracción rica, inmediatamente después de ser obtenida, se diluya a partes iguales con un diluyente comercial, se conserve a unos 17 °C para su transporte al laboratorio de criopreservación, donde se procederá a su congelación unas 20 h después de que haya tenido lugar la recogida de los eyaculados. En resumen, los eyaculados, su fracción rica para ser más concretos, se conserva en su plasma seminal a 17 °C durante unas 20 h antes de proceder a su criopreservación. La sensibilidad al enfriamiento súbito de los espermatozoides de mamíferos en general y de los de porcino en particular, ha sido demostrada hace ya tiempo (revisado por Watson, 1995). El enfriamiento súbito, es decir aquel que se produce de manera rápida y brusca inmediatamente después de la obtención del eyaculado, provoca daños estructurales irreversibles en los espermatozoides, particularmente a nivel de sus membranas (Watson, 2000). También se conoce, desde hace años (Watson, 1979; Pursel y Park, 1985), que los eyaculados de porcino soportan mejor el enfriamiento, propio del proceso de criopreservación si se les mantiene a temperatura de laboratorio durante 2-4 h desde la obtención hasta el momento de iniciar el proceso de congelación. Estos indicios científicos dejaban claramente entrever que los espermatozoides conservados durante un tiempo razonable en su propio plasma seminal eran capaces de adquirir cierta resistencia a los efectos nocivos del enfriamiento. El efecto positivo de la conservación de los espermatozoides en su propio plasma seminal durante un tiempo prudencial antes de la congelación, quedó definitivamente demostrada por Tamuli y Watson en 1994. Empleando diferentes tiempos de conservación de los espermatozoides en su plasma seminal, estos investigadores demostraron que los espermatozoides de porcino eran capaces de resistir mejor el enfriamiento cuando se les conservaba previamente en su propio plasma seminal durante unas 16 h. Este hallazgo científico ha contribuido notablemente en definir los actuales protocolos de criopreservación, y particularmente el nuestro que contempla un periodo de 18-20 h de conservación de los espermatozoides en su propio plasma seminal antes de proceder a su congelación. Por todo lo expuesto, creemos que dicho periodo de

conservación pueda resultar determinante para que luego los espermatozoides, una vez centrifugados, y con ello separados de su plasma seminal, sean capaces de soportar velocidades de enfriamiento relativamente tan altas como de 1'50 °C/min. Siendo, además, dicha capacidad independientemente del grado de crio-sensibilidad o – resistencia que demuestren poseer los espermatozoides. Obviamente, dicha creencia tiene cierto grado de subjetividad en la medida que no se ha comprobado que ocurriría con espermatozoides conservados en su plasma seminal por menos tiempo o incluso sin ningún tiempo de conservación. Al respecto comentar que bajo nuestras condiciones de trabajo nos es difícil realizar dichas comprobaciones al encontrarse nuestro laboratorio de criopreservación espermática alejado en la distancia de cualquier centro de inseminación artificial. Por otro lado, también comentar que nuestra situación geográfica es normal en los sistemas actuales de producción porcina, en los que los centros de inseminación están, por razones sanitarias, alejados de núcleos urbanos y de otras explotaciones ganaderas.

Conocer que el enfriamiento rápido del eyaculado no supone ninguna repercusión negativa para la calidad y funcionalidad post-descongelación a los espermatozoides de porcino sometidos al proceso de criopreservación, además de tener relevancia científica tiene, también, una importante trascendencia práctica y/o económica. En este sentido no debemos olvidar que el protocolo de criopreservación es, además de tedioso, largo en el tiempo. Y, paradójicamente, la etapa de enfriamiento es la que más contribuye para que el protocolo de congelación de espermatozoides de porcino tenga tan larga duración. Al emplear tradicionalmente velocidades lentas de enfriamiento de entre 0'06 y 0'18 °C/min para descender la temperatura desde los 21-17 °C hasta los 5 °C, supone que la etapa de enfriamiento tenga una duración de entre 90 y 210 min. Tiempo que, además de contrastar poderosamente con el que supone la congelación –entre 4 y 6 min- o la descongelación –entre 12 y 20 s-, representa más de 2/3 del tiempo total del proceso de criopreservación. Parece obvio, entonces, que reducir sustancialmente en el tiempo la etapa de enfriamiento permitiría agilizar el proceso de criopreservación espermática. Pasar de los 90-210 min, que dura ahora la etapa de enfriamiento, a 8-10 min, que duraría empleando una velocidad de 1'50 °C/min, posibilitaría el poder realizar todo el proceso de criopreservación en tan solo 35-40 min. La repercusión práctica, por el número de eyaculados que podrían ser criopreservados por unidad de tiempo, como económica, por

la reducción en costes laborales, sería notoria y seguro que podría repercutir en el precio final de la dosis de semen criopreservada, abaratándola.

CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de porcino sometidos al proceso de criopreservación, son capaces de soportar velocidades altas de enfriamiento para el descenso de temperatura entre los 17 y 5 °C sin repercusiones negativamente sobre la calidad espermática a lo largo del proceso de congelación y descongelación ni sobre la funcionalidad espermática a la descongelación.
2. Emplear una velocidad de enfriamiento de 1'50 °C/min en el protocolo de criopreservación espermática en porcino representaría reducir en el tiempo el protocolo a tan solo 35-40 min, frente a los 150-250 min del actual; con el correspondiente beneficio práctico y económico.

RESUMEN

Los protocolos de criopreservación para espermatozoides de porcino contemplan velocidades lentas de enfriamiento desde los 17 hasta los 5 °C. El objetivo del presente trabajo fue evaluar como velocidades rápidas de enfriamiento podrían afectar a la congelabilidad espermática, con el propósito final de reducir en el tiempo el protocolo de criopreservación. Se emplearon dos pools de semen con muestras seminales de cuatro verracos cada uno, procedentes de dos centros de inseminación artificial diferentes. Los pools de semen, a 17 °C, se enviaron al laboratorio donde se congelaron 18-20 h post recogida. Tras la centrifugación, cada pool de semen se diluyó en TGC-y (Tris, glucosa, ácido cítrico – yema de huevo), y se dividió en 4 alícuotas. Cada alícuota fue sometida a una velocidad de enfriamiento distinta: 0'08 °C/min (control), 0'13 °C/min, 0'40 °C/min y 1'50 °C/min. Alcanzados los 5 °C, se rediluyeron (TGC-y con glicerol y Orvus Es paste) y envasaron en pajuelas de 0'5 mL. Para su congelación se usó un biocongelador programable con una velocidad media de -40 °C/min. Las pajuelas congeladas se almacenaron en nitrógeno líquido por al menos 4 días. Las pajuelas se descongelaron individualmente a 37 °C por 20 s. La calidad espermática, en términos de motilidad (mediante un sistema CASA y expresada como porcentajes de espermatozoides móviles totales, con movimiento rápido y progresivo y aquellos que mostraban hipermotilidad) y viabilidad (mediante triple tinción fluorescente con lectura por citometría) se valoró después del periodo de enfriamiento y a la descongelación (a los 30 y 150 min de incubación a 37 °C). La funcionalidad espermática fue evaluada post descongelación (a los 30 y 150 min) en términos de inestabilidad de membrana plasmática (Merocianina 540 y Yo-Pro 1), apoptosis inicial (Annexin-V e Ioduro de propidio, IP) y la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS, CM-H₂DCFDA e IP) en muestras seminales incubadas (30 min a 39 °C en 5 % de CO₂) en un medio capacitante. Se realizaron 6 replicados. Los datos fueron analizados con un ANOVA mixto en el que la velocidad de enfriamiento y el pool de semen fueron los efectos fijos. Ni la calidad ni la funcionalidad espermática se vieron afectadas ($P > 0'05$) por la velocidad de enfriamiento en ninguno de los dos pools de semen. Sí hubo diferencias entre los pools en algunos de los parámetros de calidad o funcionalidad espermática evaluados ($P < 0'05$). Por lo que podemos concluir que los espermatozoides de porcino, sometidos a criopreservación, son capaces de soportar velocidades altas de enfriamiento, de al menos hasta 1'50 °C/min, sin repercusiones negativas sobre la calidad ni funcionalidad espermática.

SUMMARY

Fast cooling rates from 17 to 5 °C do not impair boar sperm cryosurvival

A slow cooling from 17 to 5°C is considered an essential step to cryopreserve boar spermatozoa. The aim of the present study was to evaluate how faster cooling rates influence the sperm cryosurvival. The semen sources were 2 different semen pools (with sperm-rich ejaculate fractions from 4 different mature and fertile boars each one), which were stored at 17 °C during 18-20 h before sperm cryopreservation. After centrifugation at 17 °C, the sperm pellet of each pool was diluted in a Tris-citric extender supplemented with 20 % egg-yolk ($1,500 \times 10^6$ spermatozoa/mL), and immediately split into 4 aliquots, which were cooled to 5 °C using 4 different cooling rates: 0.08 °C/min (usual) or at 0.13, 0.40 and 1.50 °C/min. After a second dilution ($1,000 \times 10^6$ spermatozoa/mL) in Tris-egg yolk extender supplemented with a final concentration of 3% of GLY, the sperm aliquots were dispensed into 0.5-mL straws, and frozen in a programmable cell freezer at 40 °C/min. Thawing was carried out in a water bath at 37 °C for 20 s. Sperm quality, assessed according to motility (assessed using a CASA system and expressed as percentages of total sperm motility, rapid and progressive motility and hyperactivated sperm population) and viability (plasma membrane and acrosome integrity cytometrically assessed by a triple fluorescent stain), was recorded at 5 °C (after cooling step) after thawing and holding at 37°C for 30 and 150 min. Sperm functionality, flow cytometrically assessed according to membrane lipid packing disorder (M540/YoPro1), early apoptosis (Annexin V-FITC) and intracellular generation of reactive oxygen species (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), was recorded in thawed samples (30 and 150 min after thawing) incubated in a capacitation media for 30 min at 39 °C and 5 % CO₂. Each semen pool was cryopreserved 6 times. Data were analyzed using a mixed model ANOVA with semen pool and cooling rate as fixed effects. Semen pool influences ($P < 0.01$) sperm quality and functionality. The interaction semen pool x cooling rate was not significant ($P > 0.05$) for any of the sperm quality and functionality assessments. The sperm quality and functionality did not differ ($P > 0.05$) among cooling rates. In conclusion, boar sperm subjected to cryopreservation process are able to support fast cooling rate from 17 to 5 °C without modifying sperm cryosurvival rates.

Résumé

Les vitesses rapides de refroidissement de 17 °C jusqu'à 5 °C ne altère pas la cryosurvie des spermatozoïdes de porc

Les protocoles de cryoconservation de spermatozoïdes de porc incluent des vitesses lentes de refroidissement de 17 °C jusqu'à 5 °C. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de vitesses rapides de refroidissement sur le succès de la congélation de la semence, afin de réduire la durée du protocole de cryoconservation. Nous avons employé deux mélanges ou pools de semences qui viennent chacune de quatre porcs différents. Les mélanges de semence ont été envoyés au laboratoire à 17 °C et ont été congelés entre 18 h et 20 h après leur prélèvement. Après la centrifugation, chaque échantillon de semence a été dilué avec TGC-y (Tris, glucose, acide citrique – jaune d'œuf) et a été divisé en quatre parties. Chaque partie a été refroidie à des vitesses différentes : 0,08 °C/min (contrôle), 0,13 °C/min, 0,40 °C/min et 1,50 °C/min. Arrivés à 5 °C, les échantillons ont été dilués (TGC-y avec glycérol et Orvus Es paste) et emballés dans des paillettes de 0,5 ml. Pour la congélation des échantillons de semence nous avons utilisé un biocongélateur programmable avec une vitesse moyenne de -40 °C/min. Les paillettes congelées ont été gardées dans du nitrogène liquide pendant au moins quatre jours. Les paillettes ont été décongelées individuellement à 37 °C pendant 20 secondes. La qualité spermatique, en terme de mobilité (Système CASA, et exprimé en pourcentage des spermatozoïdes mobiles totaux, spermatozoïdes avec mobilité rapide et progressive et spermatozoïdes hyper mobiles) et viabilité (triple teinture fluorescente avec lecture par cytométrie) a été évaluée après la période de refroidissement et après la décongélation (à 30 min et 150 min d'incubation à 37 °C). Le fonctionnement spermatique a été évalué après décongélation (à 30 et 150 min) en termes d'instabilité de la membrane plasmique (Merocianin 540 et Yo-Pro 1), apoptose (Annexin-V et Propidium Iodide, IP) et production intracellulaire des substances réactives à l'oxygène (ROS, CM-H₂DCFDA et IP) des échantillons de semence incubées (30 min à 39 °C et 5 % CO₂) dans un diluent capacitant. Nous avons réalisé 6 répliques. Les données ont été analysées avec un modèle mixte ANOVA, la vitesse de refroidissement et le mélange ou pool de semence sont les facteurs fixes. Ni la qualité, ni le fonctionnement spermatique ont été affectés ($p > 0,05$) par la vitesse de refroidissement dans aucun mélange (pool) de semence. Il n'y a pas d'interaction ($p > 0,05$) entre la vitesse de refroidissement et le mélange de semence. Le mélange de semence influe ($p < 0,05$) sur la qualité et sur le fonctionnement spermatique. En conclusion, des spermatozoïdes de porc soumis à la cryopreservation sont capables de supporter des vitesses rapides de refroidissement, d'au moins 1,50 °C/min, sans répercussions négatives sur la qualité et le fonctionnement spermatique.

BIBLIOGRAFÍA

- Aalbers, J.G., Mann, T. y Polge, C. (1991). Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. *J. Reprod. Fertil.* 2, 42-53.
- Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P. y Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by Pattern Analysis of Computer-Assisted Motility Assessments. *Biol. Reprod.* 60, 32–41.
- Abeydeera, L.R. y Day, B. N. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 46, 537-544.
- Aitken, R.I. y Clarkson, JS. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 81, 459-469.
- Almlid, T. y Johnson, L.A. (1988). Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim. Sci.* 66, 2899-2905.
- Althouse, G.C., Wilson, M.E., Kuster, C. y Parsley, M. (1998). Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50, 535-543.
- Amann, R.P. y Hammerstedt, R. H. (1993). *In vitro* Evaluation of Sperm Quality: An Opinion. *J. Androl.* 14(6), 397-406.
- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroestsch, T.G. y Pauls, P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.* 66, 354–360.
- Bader, H. (1967). Untersuchungen u"ber den Einfluss unterschiedlicher Abku"hlzeiten beim Tiefgefrieren von Ebersperma auf die Bewegungsaktivita"t der Samenzellen. Hannover, Germany: Tiera"rztliche Hochschule Hannover. pp. 210.
- Bailey, L.; Lessard, C.; Jacques, J., Breque, C.; Dobrinski, I.; Zeng, W. y Galantino-Homer, H. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70, 1251–1259.
- Ball, B.A., Vo, A.T. y Baumber, J. (2001). Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res.* 62(4), 508-515.

- Ball, B.A., Vo, A.T., (2002). Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C-11-BODIPY581/591. *J. Androl.* 23, 259–269.
- Ball, B.A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Repro. Sci.* 107, 257–267.
- Barbas, J.P. y Mascarenhas, R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10, 49–62.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. y Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130(4), 1910-1917.
- Baust, J.M. (2002). Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol* 1, 17–31.
- Belbin, L. (1993). PATN, Pattern Analysis Package. Division of Wildlife and Ecology. Canberra, Australia: CSIRO; 1993.
- Berger, B. y Fischerleitner, F. (1992). On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. *Reprod. Dom. Anim.* 27, 266–270.
- Blanco, O. (1998). Análisis objetivo de la motilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 170 pp.
- Boar Semen Conferences. (2005). History of the Boar Semen Conferences. *Theriogenology* 63, 279–282.
- Boyers, S.P., Davis, R.O. y Katz, D.F. (1989). Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil.* 12, 167–200.
- Brouwers, J.F. y Gadella, B.M. (2003). *In situ* detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radic. Biol. Med.* 35(11), 1382–1391.
- Brouwers, J.F., Silva, P.F.N. y Gadella, B.M. (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze–thawing. *Theriogenology* 63, 458–469.
- Buege, J.A. y Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52, 302-310.

- Buhr, M.M., Curtis, E.F. y Kakuda, N. (1994). Effect of boar sperm cryopreservation on the composition and behaviour of head membrane lipids. *Cryobiology* 31, 224-238.
- Bwanga, C.O, De Braganca, M.M., Einarsson, S. y Rodriguez- Martinez, H; (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *J. Vet. Med.* 37, 651-658.
- Bwanga, C.O. (1991). Cryopreservation of boar semen. 1: A literature review. *Acta Vet Scand.* 32(4), 431-453.
- Caballero, I., Vazquez, J.M., Mayor, G.M., Almiñana, C., Calvete, J.J., Sanz, L., Roca, J. y Martinez, E.A. 2008. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *J. Androl.* ISSN 0105-6263.
- Canvin, A. T. y Buhr, M. M. (1989). Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *J. Reprod. Fert.* 85, 533-540.
- Carter, W. O., Narayanan, P. K. y Robinson, J. P. (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 55, 253–258.
- Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA y Roca J. (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* 25, 389-258.
- Centola, G.M. (1996). Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Arch. Androl.* 36(1), 1-7.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Suraib, P. y Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Repro. Sci.* 58, 99–111
- Cormier, N., Sirard, M.A. y Bailey, J.L. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18, 461–468.
- Crabo, B.G. (1990). Preservation of boar semen: a worldwide perspective. In: Proceedings of second International Conference of Boar Semen Preservation. Beltsville, 1990, Johnson, L.A. and Rath, D. (eds). Paul Parey publ. pp. 3-9.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J.M. y Martínez, E.A. (2005). Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa. *J Androl* 26, 610–618.
- Cheng, Z. y Li, Y. (2007). What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *Chem. Rev.* 107, 748-766.

- Darin-Bennett, A. y White, I.G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*. 14(4), 466-470.
- Davis, R.O. y Siemers, R.J. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 857–869.
- De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. *J. Androl.* 13, 368-378.
- Devireddy RV, Fahrig B, Godke RA and Leibo SP. (2004). Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. *Mol. Rep. Dev.* 67, 446–457.
- Donoghue, A.M., Garner, D.L., Donoghue, D.J. y Johnson, L.A. (1995). Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poult. Sci.* 74, 1191–1200.
- Drummen, G.P., Gadella, B.M., Post, J.A. y Brouwers, J.F. (2004). Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY^{581/591}. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1635–1644.
- Ekwall, H.; Hernandez, M.; Saravia, F. y Rodriguez-Martinez, H. (2007). Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar semen frozen in medium-straws and MiniFlatPacks. *Theriogenology* 67, 1463–1472.
- Ekwall, H. (2009). Cryo-scanning electron microscopy discloses differences in dehydration of frozen boar semen stored in large containers. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 62–68.
- Eriksson, B.M; Vázquez, J.M., Martinez, E.A.; Roca, J., Lucas, X., Rodriguez-Martinez, H. (2000). Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 55(8), 1593-605.
- Fernández-Santos, M.R., Estes, M.J., Soler, A.J., Montoro, V. y Garde, J.J. (2006). Effects of Egg Yolk and Cooling Rate on the Survival of Refrigerated Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 114–118.
- Fiser, P.S. y Fairfull, R.W. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.* 25(2), 123-129.

Fiser, P.S., Fairfull, R.W., Hansen, C., Panich, P.L., Shrestha, J.N. y Underhill, L. (1993). The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 190–195.

Flesch, F.M., Brouwers, J.F., Nievelstein, P.F., Verkleij, A.J., Van Golde, L.M., Colenbrander, B. y Gadella, B.M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell. Sci.* 114, 3543–3555.

Fraser, L. y Strzezek, J. (2005). Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod. Dom. Anim.* 40, 530–536.

Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272:18515–18517.

Fuller, S.J. y Whittingham, D.G. (1996). Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fert.* 108, 139-145.

Fuller, S.J. y Whittingham, D.G. (1997). Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol. Reprod. Develop.* 46, 313–324.

Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690–701.

Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A. y Pace, M.M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34, 127–138.

Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L. y Haugland, R.P. (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl.* 15, 620–629.

Garner, D.L. y Johnson, L.A. (1995). Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biol. Reprod.* 53, 276-284.

Garner, D.L., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R. y Johnson, L.A. (1996). Porcine sperm viability, oocyte fertilisation and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* 45,1103–1113.

- Gerrits, R.J., Lunney, J.K., Johnson, L.A., Pursel, V.G., Kraeling, R.R., Rohrer, G.A. y Dobrinsky, J.R. (2005). Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology* 63, 283–299.
- Gillan, L., Evan, G. y Maxwell, W.M.C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445–457.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H., Schmehl Jr., M.K.L., Maki-Laurila, M. y Bower, R.E. (1971). Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar semen. *A.I. Digest* 19:12.
- Graham, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Repro. Sci.* 68, 239–247.
- Graham, J.K., Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, 492–504.
- Green, C.E. y Watson, P.F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122(6), 889-898.
- Großfeld, R.; Sieg, B.; Struckmann, C.; Frenzel, A.; Maxwell, WMC y Rath, D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70: 1225–1233.
- Guthrie, H.D. y Welch, G.R. (2005). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63, 396–410.
- Guthrie, H.D. y Welch, G.R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* 84, 2089-2100.
- Guthrie, H.D. y Welch, G.R. (2008). Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 70, 1209–1215.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. y Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J. Androl.* 11, 73-88.
- Hammerstedt, R.H. y Graham, J.K. (1992). Cryopreservation of poultry sper: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29: 26-38.
- Hancock, J.L. (1951). A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature* 167(4243), 323-324.

- Hancock, J.L. (1957). The morphology of boar spermatozoa. *J. R. Microsc. Soc.* 76(3), 84-97.
- Harrison, R. A. (1997). Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 195–211.
- Harrison, R.A., Ashworth, P.J. y Miller, N.G., (1996). Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 378–391.
- Hernández, M., Roca, J., Ballester, J., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Johannisson, A., Saravia, F. y Rodríguez-Martínez, H. (2006). Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *J. Androl.* ISSN 0105-6263.
- Hernández, M.; Ekwall, H.; Roca, J.; Vazquez, J.M.; Martinez, E. y Rodríguez-Martínez, H. (2007a). Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology.* 54, 63-70.
- Hernández, M.; Roca, J.; Gil, M.A.; Vázquez, J.M. y Martínez, E.A. (2007b). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 67, 1436–1445.
- Hernández, M.; Roca, J.; Calvete, J.J.; SANZ, L.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A.; Vázquez, J.M. y Martínez, E.A. (2007c). Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl.* 28, 689–697.
- Ho, H.C. y Suarez, S.S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122, 519–526.
- Holt, W.V. y North, R.D. (1986). Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J. Reprod Fertil* 78, 447-457.
- Holt, W.V.; Morris, G.J.; Coulson, G. y North, R.D. (1988). Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.* 246, 305-314.
- Holt, W.V. y Medrano, A. (1997). Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 213-222.

- Holt, C., Holt, W.V., MOORE, H.D.M., Reed, H.C.B. y CURNOCK, R.M. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. *J. Androl.* 18, 312-323.
- Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Science.* 62, 3–22.
- Holt, W.V., Medrano, A., Thurston, L.M. y Watson, P.F. (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63, 370–382.
- Iguer-Ouada, M. y Verstegen, J. (2001). Evaluation of the Hamilton Thorn Computer Based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology* 55, 733-749.
- Iype, P. T., Abraham, K. A. y Bhargava, P. M. (1963). Further evidence for a positive role of acrosome in the uptake of labelled amino acids by bovine and avian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 5, 151.
- Januskauskas, A; Gil, J; Söderquist, L; Håård, M. G.; Håård, M. Ch.; Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. *Theriogenology* 52, 641-656.
- Jeong, Y.J; Kim, M.K.; Song, H.J; Kang, E.J.; Ock, S.A.; Kumar, B.M; Balasubramanian, S. y Rho, G.J. (2009). Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58, 181–189.
- Johnson, L.A., Pursel, V.G., Gerrits, R.J. y Thomas, C.H. (1972). Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids. *J. Anim. Sci.* 34, 430-434.
- Johnson, LA; Weitze, KF; Fiser, P; Maxwell, WMC. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Science* 62: 143–172.
- Jones, R.C. y Stewart, D.L. (1979). The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 56, 233-238.
- Knuth, U.A., Yeung, C.H. y Nieschlag, E. (1987). Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. *Fertil. Steril.* 48, 118-124.

- Kobayashi, H., Gil-Guzman, E., Mahran, A.M., Rakesh, Y., Nelson, D.R., Thomas, A.J. Jr. y Agarwa, A. (2001). Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J. Androl.* 22(4), 568-574.
- Kolettis, P., Sharma, R.K., Pasqualotto, F., Nelson, D., Thomas Jr., A.J. y Agarwal, A. (1999). The effects of seminal oxidative stress on fertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril.* 71, 249–255.
- Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E. y Grevle, I.S. (2002). Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet. Scand.* 43, 49-55.
- Kotzias-Bandeira E., Waberski, D. y Weitze, KF. (1997). Cooling of boar spermatozoa prior to freezing and post thaw quality and evaluation of membrane state using chlortetracycline (CTC) staining. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 104(8), 302-306.
- Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B. y Auger, J. (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum. Reprod.* 13, 611-619.
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K.M., Bardoloi, R.K, Das, A., Kumar, S., Naskar, S. (2008). Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.006
- Langner, M. y Hui SW. (1993). Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1149, 175–179.
- Larsson, K., Einarsson, S. y Swensson, T. (1977). The development of a practicable method for deep freezing of boar spermatozoa. *Nord Vet. Med.* 29, 112–118.
- Larsson, K., (1978). Current research on the deep freezing of boar semen. *World Rev. Anim. Prod.* 24 (4), 59–64.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., Van Schie, R.C., LaFace, D.M. y Green, D.R. (1995). Earlier distribution of phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition of overexpression of Bcl-2 and AB1. *J Exp Med* 182, 1542–1556.
- Martín-Rillo, S., Pintado, B., De Alba, C., Sánchez, R., García, P., Corcuera, D. y Artiga, C. (1996). Effect of cooled and frozen boar semen on embryo development. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 309-310.

- Massanyi, L. (1989). Evaluation of the motility of boar sperm using computer technics. *Vet. Med. (Praha)* 34(3), 163-170.
- Maxwell, W.M.C. y Johnson, L.A. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Rep. and Dev.* 46, 408–418.
- Medeiros, C.M.O., Forrel, F., Oliveira, A.T.D. y Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why is better?. *Theriogenology* 57, 327-344.
- Mortimer, D., Curtis, E.F. y Dravland, J.E. (1987). Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J. Reprod. Fertil.* 81, 127–135.
- Mortimer, S.T. (2000). CASA: practical aspects. *J. Androl.* 21, 515–524.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K. y Gadella, B.M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma and acrosome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod.* 68, 1828–1835.
- O'Flaherty, C., De Lamirande, E. y Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology & Medicine* 41, 528 – 540.
- Oosterhuis, G.J.E., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C.B., Schoemaker, J. y Vermes, I. (2000). Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?. *Fertil. Steril.* 74(2), 245-250.
- Owen, D.H. y Katz, D.F. (1993). Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J Androl* 14, 210-221.
- Pap, E.H.W., Drummen, G.P.C., Winter, V.J., Kooij, T.W.A., Rijken, P., Wirtz, K.W.A., Op den Kamp, J.A.F., Hage, W.J. y Post, J.A. (1999). Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY^{581/591}. *FEBS Letters* 453, 278-282.
- Paquignon, M. y Courot, M. (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Krakow, Vol. 4, pp. 1041-1044.
- Parks, J.E. y Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255–66.
- Parks, J.E. y Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 38(2), 209-222.

- Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M. and Rodríguez-Martínez, H. (2003). Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677–689.
- Peña, F.J. (2007). Detecting subtle changes in sperm membranes in veterinary andrology. *Asian J. Androl.* 9(6), 731–737.
- Polge, C., Smith, A.U. y Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164(4172), 666.
- Polge, C. 1956. Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.* 68, 62.
- Polge, C., Salamon, S., Wilmut, I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87(15), 424-429.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. y Schulman, L.L. (1972). Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 35, 580-584.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci.* 40(1), 99-102.
- Pursel, V.G.; Schulman, L.L. y Johnson, L.A. (1978). Effect of Orvus Es Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. *J. Anim. Sci.* 74 (1), 198-202.
- Pursel, V.G. y Park, C.S. (1985). Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In. Proceedings of First International Conferences on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, 1985, Johnson, L.A. and Larsson, K. (eds). pp. 147 – 155.
- Quintero-Moreno, A.A. y Rodríguez, J.E. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral – Fac. Med. Vet. UAB - Barcelona. 164 p.
- Rath, D.; Moench-Tegeder, G.; Taylor, U. y Johnson, L.A. (2009). Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71, 22–29
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M.M. y Gadella, B.M. (2001). Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Repro.* 65, 462–470
- Resli, I., Gaspar, R., Szabo, G., Matyus, L. y Damjanovich, S. (1983). Biophysical analysis of fertility of sperm cells. *Magy Allatorvosok Lapja* 38, 38–41.

- Robertson L, Watson PF. (1986). Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 77, 177-85.
- Robertson, L., Watson, P.F. y Plummer, J.M., (1988). Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Lett.* 9, 286–293.
- Robertson, L., Bailey, J.L. y Buhr, M.M. (1990). Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 143-149.
- Roca, J.; Gil, M.A.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J. y Martinez, E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with Butylated Hydroxytoluene. *J. Androl.* 25, 397–405.
- Roca, J.; Rodríguez, M.J.; Gil, M.A.; Carvajal, G.; García, E.M., Cuello, C.; Vásquez, J.M. y Martínez, E.A. (2005). Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.*, 26, 15–24.
- Roca, J., Hernández, M., Carvajal, G., Vázquez, J.M. y Martínez, E.A. (2006a). Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84, 2692-2699.
- Roca, J., Vázquez, J.M., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I. y Martínez, E.A. (2006b). Challenges in Pig Artificial Insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 41, suplemento 2, 43–53.
- Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Vázquez, J.M., Bolarín, A., Hernández, M., Saravia, F., Wallgren, M. y Martínez, E.A. (2006c). Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 62, 261-275.
- Rodriguez-Martínez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68, 138–146.
- Rohloff, D. (1967). Tiefgefrierung von Ebersperma in pelletform bei -196°C. *Zuchthyg.* 2, 75–7.
- Safranski, T.J. (2008). Genetic selection of boars. *Theriogenology* 70, 1310–1316.
- Saleh, R.A. y Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *J. Androl.* 23, 737 – 752.
- Saravia, F., Hernández, M., Wallgren, M., Johannisson, A. y Rodríguez-Martínez, H. (2007). Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *J. Androl.* 30, 485–499.

- Saravia, F.; Wallgren, M.; Johannisson, A., Calvete, J.J., Sanz, L., Peña, F.J., Roca, J. y Rodríguez-Martínez, H. (2009a). Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology* 71, 662–675.
- Saravia, F., Wallgren, M. y Rodríguez-Martínez, H. (2009b). Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2009.04.014.
- Schmassmann, A., Mikuz, G., Bartsch, G. y Rohr, H. (1979). Quantification of human sperm morphology and motility by means of semi-automatic image analysis systems. *Microsc. Acta.* 82(2), 163-78.
- Schmidt, H. y Kamp, G. (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128, 171–179.
- Silva, P.F.N. y Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958–978.
- Tamuli, M. K. y Watson, P.F. (1994). Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after eyaculation. *Veterinary Record* 135, 160-162.
- Thomas, A.D., Meyers, S.A. y Ball, B.A. (2006). Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1531–1550
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F. y Holt, W.V. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.* 66, 545–554.
- Vasco, D., Hernández, M., Vásquez, J.M., Martínez, E.A. y Roca, J. (2008). Sustancias Oxígeno Reactivas (ROS) en semen congelado-descongelado de porcino. *Ciencia y Tecnología* 1, 23-29.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection significance of apoptosis of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184(1), 39-51.
- Vermes, I., Haanen, C. y Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* 243, 167–190.

- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. y Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- Wagner, H.G. y Thibier, M. (2000). World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. In: Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, vol. 2, p. 77 (abstract).
- Walton, A. (1957). Cold shock of spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 147(929), 508-509.
- Watson, P.F. (1979). An objective method for measuring fluorescence of individual sperm cells labelled with 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate (ANS) by means of photomicrography and densitometry. *J. Microsc.* 117(3), 425-429.
- Watson, P.F. (1981). The effects of cold shock on sperm cell membranes. In "The effects of low temperatures on Biological Membranes. (Eds G.J. Morris and A. Clarke.) pp. 189-218. (Academic Press: London).
- Watson, P. F. y Plummer, J. M. (1985). The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: Proceedings of first International Conference of Boar Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, 1985, Johnson, L.A. and Larsson, K. (eds). pp. 113-127.
- Watson, P.F. y Morris, G.J. (1987). Cold shock injury in animal cells. In "Temperature and animal cells. Symposium of the Society for Experimental Biology". N° 41. (Eds K. Bowler and B.J. Fuller) pp. 311-340. (The Company of Biologists: Cambridge).
- Watson, P.F. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. En Lamming, G.E. (ed) Marshall's physiology of reproduction, vol. 2. Edimburgo, 4ª Ed. Churchill Livingstone.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7(4), 871-891.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved. *Anim. Reprod. Science.* 60-61, 481-492.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. (1975). Deep freezing of boar sperm laboratory and insemination results using the Hulsenger paillete method. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 82, 261-267.
- White, I.G., (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 639-658.

Williamson, P., Mattocks, K. y Schegel, R.A. (1983). Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochim. Biophys. Acta* 732, 387–393.

Woelders, H. (1991). Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Anim. Suppl.* 1, 145-164.

Woelders, H., Matthijs, A., Zuidberg, C.A. y Chaveiro, A.E. (2005). Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology* 63(2), 383-95.

Zeng, W.X., Shimada, M., Isobe, N. y Terada, T. (2001). Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology* 56, 447-458.